VOL. III, No. 2 APRIL 1951

PLANT AND SOIL

International Journal of Plant Nutrition, Plant Chemistry, Soil Microbiology and Soil-borne Plant Diseases

ALLES KOMT TEREGT M·N

MARTINUS NIJHOFF — PUBLISHER — THE HAGUE

PLANT AND SOIL

International Journal of Plant Nutrition, Plant Chemistry, Soil Microbiology and Soil-borne Plant Diseases

Revue internationale de nutrition des plantes, de chimie végétale, de microbiologie du sol et des maladies des plantes en rapport avec le sol

Internationale Zeitschrift für Pflanzenernährung, Pflanzenchemie, Bodenmikrobiologie und bodenbedingte Pflanzenkrankheiten

Issued under the auspices of the "Nederlands Genootschap voor Landbouwwetenschap" (Netherlands Society of Agricultural Science)

Executive Editors: D. I. Arnon, Berkeley; J. Baeyens, Louvain; F. C. Gerretsen, Groningen; E. G. Mulder, Groningen; F. J. Richards, London; A. C. Schuffelen, Wageningen: F. Steenbjerg, Copenhagen.

Consulting Editors: Wm. A. Albrecht, Columbia, Mo.; C. Arnaudi, Milano; A. Demolon, Paris; E. Gäumann, Zürich; L. Gisiger, Liebefeld-Bern; F. G. Gregory, London; G. W. Harmsen, Delft; J. den Holder, Ghent; T. H. van den Honert, Leiden; V. J. Koningsberger, Utrecht; J. Lavollay, Paris; W. J. Lütjeharms, Bloemfontein; H. Lundegårdh, Uppsala; E. Melin, Uppsala; M. Mes, Pretoria; M. Ødelien, Ås; E. J. Petersen Copenhagen; C. S. Piper, Adelaide; J. Smit, Wageningen; H. G. Thornton, Harpenden (Herts.); S. Tovborg Jensen, Copenhagen; A. I. Virtanen, Helsinki; S. A. Waksman, New Brunswick; F. W. Went, Pasadena; Joh^{a}. Westerdijk, Baarn; J. G. Wood, Adelaide.

CONTENTS: TABLE DES MATIÈRES: INHALT:

F. Steenbjerg, Yield curves and chemical plant analyses . . . 97

G. W. Harmsen, Die Bedeutung der Bodenoberfläche für die Humusbildung 110

L. H. P. Jones and *G. W. Leeper,* The availability of various manganese oxides to plants 141

L. H. P. Jones and *G. W. Leeper,* Available manganese oxides in neutral and alkaline soils 154

L. K. Wiersum, Water transport in the xylem as related to calcium uptake by groundnuts (Arachis hypogaea L.) . . . 160

L. J. Audus, The biological detoxication of hormone herbicides in soil 170

Printed in the Netherlands

Plant and Soil III, 97-192 The Hague, April 1951

Plant and Soil III, no 2 April 1951

YIELD CURVES AND CHEMICAL PLANT ANALYSES

by F. STEENBJERG

The Royal Veterinary and Agricultural College, Copenhagen

Depa-tment of Soil Fertility

Questions relating to the relative contents of plant nutrients in a crop are, in various ways, closely connected with questions of fundamental importance concerning the fertilizing technique as, for instance, the relationship between applied and absorbed quantities of the plant nutrient in question, the relationship between the absorbed quantity of the plant nutrient and the production of dry matter, and finally the relationship between the applied quantity of the same plant nutrient and the production of dry matter.

With a more comprehensive knowledge of these relationships, many problems associated with fertilizing may be solved in principle e.g. problems connected with the interpretation of chemical plant analyses.

The use of plant analyses as a means of determining the nutrient status of plants is well known. During the last few decades, however, a great deal of work has been directed exclusively towards the application of chemical plant analyses as a means of diagnosing the nutrient requirements of plants and soils [1]).

It is not considered necessary to include in this paper, details as to (*a*) the rapid chemical methods used (*b*) the particular plant organs chosen for analysis and (*c*) the calculation of the analytical results etc. Such details may be obtained from the review by Goodall & Gregory [1]).

The interpretation or evaluation of the analytical results, however, is of decisive importance in the application of the chemical plant analysis. What for instance, does a certain percentage nutrient content in barley leaves mean? Just as we must interpret the results of chemical soil analysis or the results of field trials, so must we

interpret the results of chemical plant analyses if these results are to throw any light on other special cases.

In general three different methods have been used in the interpretation of chemical plant analyses, of which two are of particular importance.

Interpretation I: Figure 1 *) illustrates for a given crop (or part of the crop) the relationship between increase in yield (dry matter) after the application of a certain quantity of a plant nutrient, and the percentage content of this nutrient in the unfertilized crop. The evaluation of the analytical results may also be made as

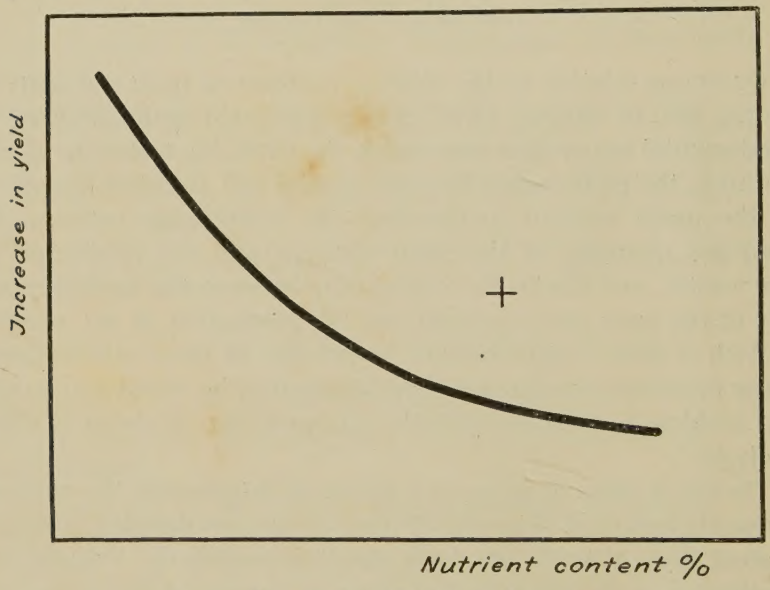


Fig. 1. Interpretation I

follows: standard values for the plant nutrients in the crop are found, these standard values (limiting or basic values) being determined for three or more levels e.g. high, medium and low content, due attention being paid to the time during the growing season at which the samples are taken i.e. the stage of development of the crop.

Interpretation II: Figure 2 illustrates the relationship between the dry matter production (total yield or a particular fraction of the yield) and the percentage nutrient content of the dry matter (yield).

*) Except for figure 4, the figures referred to in the text are all schematic.

It will be observed that with increasing yield, the percentage nutrient content normally rises (full line).

Thus in both methods of interpretation, the percentage nutrient content may be used for diagnosis. The question arises however — on what principles or laws are such interpretations based? Before enlarging upon this point it is necessary to bear in mind that there are four groups of factors which influence the nutrient content of a plant.

These are:

(1) Soil factors in the most comprehensive sense (including also the ability of the soil to supply the crop with water).

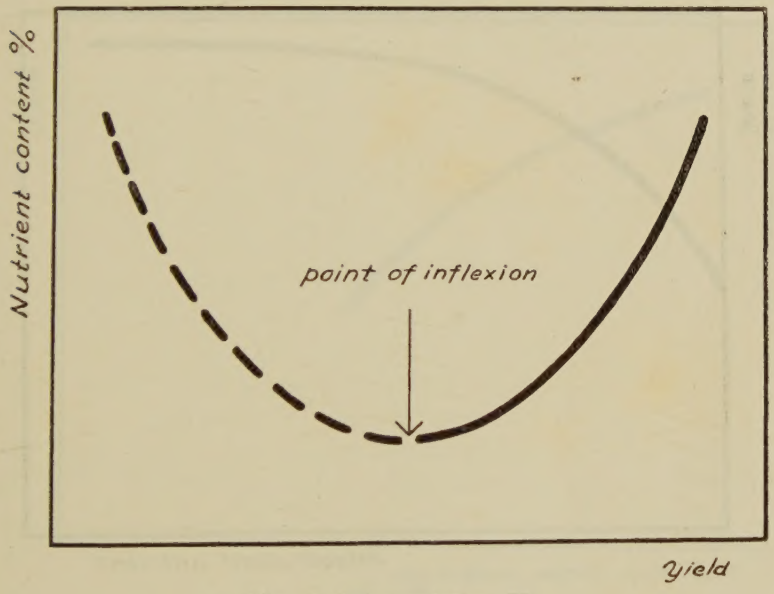


Fig. 2. Interpretation II

(2) The nature of the crop.

(3) Climatic conditions including factors like light and temperature.

(4) The time during the growing season at which the plants are sampled i.e. the stage of development of the crop.

According to interpretation I, variations occur from place to place and from one year to another, in (1) the soil factors and (3) the climatic conditions. On the other hand (2) the nature of the crop and often (4) the time of sampling (stage of development of the crop) are kept constant.

According to interpretation II, variations in (1) the soil factors, are reduced to a minimum (e.g. by sampling from as small an area as possible) whilst the remaining factors grouped under (2), (3), and (4) are kept constant or as nearly so as possible.

We can now discuss the basic principles underlying the interpretation of chemical plant analyses according to figures 1 and 2.

For these interpretations to be valid, the presupposition is that the law of diminishing returns holds in all cases concerned. The argument would be further simplified if the relationship between applied and absorbed quantities of a plant nutrient was

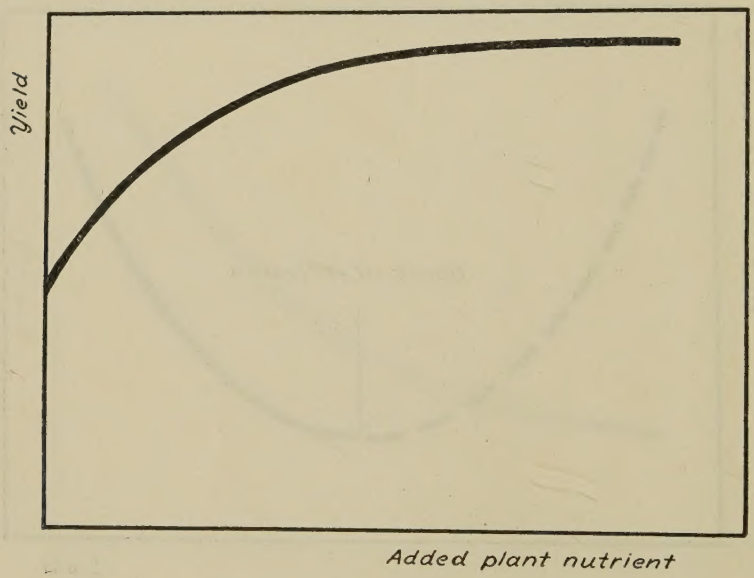


Fig. 3a

linear but even if the line is not straight i.e. if the rate of absorption steadily decreases with increasing applications of the particular nutrient, this does not alter the fundamental considerations.

From figures 3*a* and 3*b* it follows that normally, a high yield is associated with a high percentage content of the nutrient and with small increases in yield.

Where, however, the law of diminishing returns does not apply, serious errors may arise in the interpretation unless the utmost care is taken; cf. figures 3*c* and 3*d*. In figure 3*d*, the relationship between dry matter production and quantity of nutrient absorbed is

expressed by an *S*-shaped curve i.e. with first increasing then decreasing returns. This means that the relationship between dry matter production and quantity of nutrient applied must also be represented by an *S*-shaped curve, irrespective of whether the rate of absorption is constant or steadily decreases with increasing applications of that nutrient (fig. 3*c*). The relationship between dry matter production (yield) and *percentage* nutrient content must therefore be expressed by a curve of the form given in figure 2 (dotted line + full line).

In other words we may find that a high percentage content of a

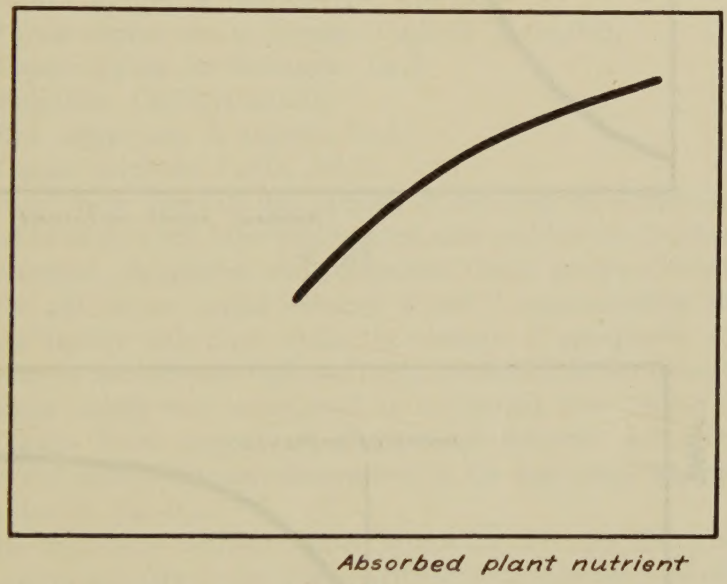


Fig. 3b

particular nutrient is associated with a low production of dry matter, in which case there is still the possibility of a large increase in yield (cf. cross in fig. 1). This would mean serious errors in the interpretation according to both methods I and II (see dotted parts of the curves given in figs. 2 and 3*d*).

Therefore, in order to be able to use chemical plant analyses successfully it is important to know as much as possible about the influence exerted by the group of yield factors mentioned above (1, 2, 3 and 4) on the shape of the yield curve, its flexibility and its position in the coordinate system.

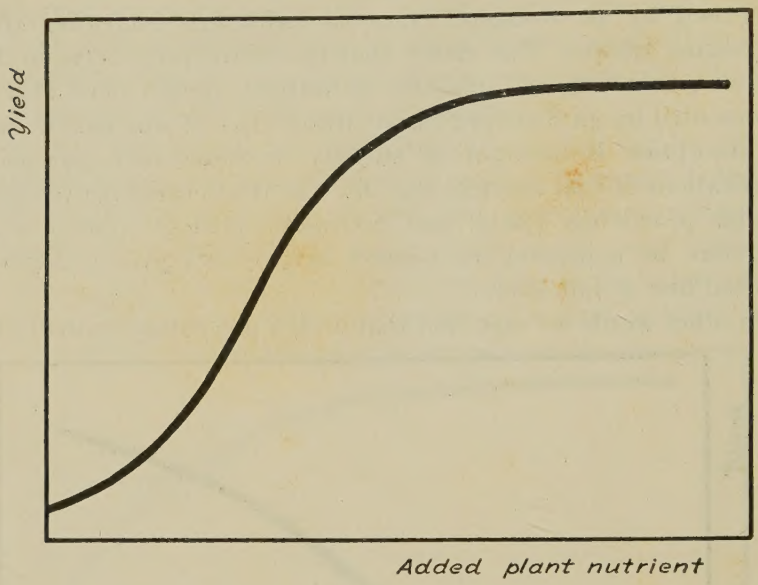

Yield
Added plant nutrient

Fig. 3c

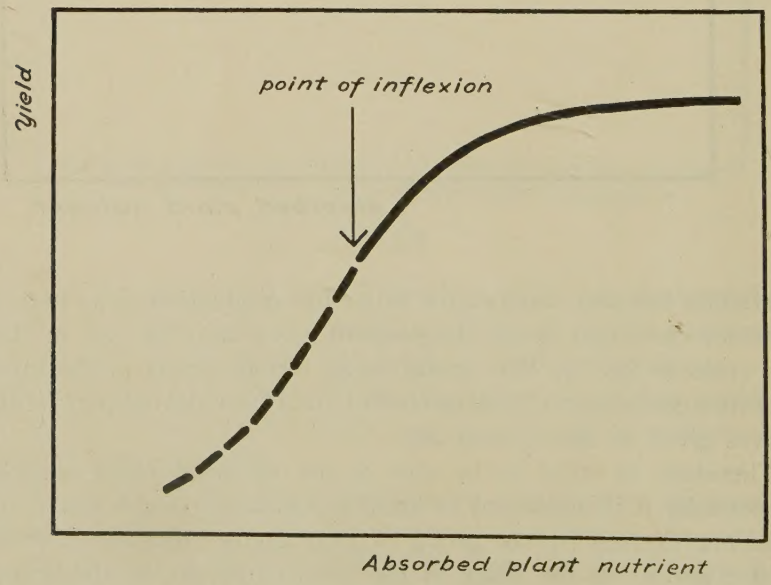

Yield
point of inflexion
Absorbed plant nutrient

Fig. 3d

Before commenting further on the value of such increased knowledge of the form of the yield curve, it would be appropriate to give a concrete example in which one can go into further detail about the points arising out of the discussion on fundamentals. This will be done first by describing some of our typical experimental results and then by discussing their interpretation (method II).

Over a period of 3 years (1939–41) pot experiments were carried out with the same soil to which had been added increasing quantities of various copper fertilizers. These, applied in the first year, were as follows:

1. Copper pyrites or chalcopyrite, $CuFeS_2$
2. Purple copper ore or bornite, Cu_3FeS_3 or Cu_5FeS_4
2a. Copper glance or chalcocite, Cu_2S
3. Malachite, $CuCO_3.Cu(OH)_2$
4. Red copper ore or cuprite, Cu_2O
5. Copper sulphate, $CuSO_4.5H_2O$.

Each of these minerals was applied in two degrees of fineness. The soil in all pots was otherwise treated alike and heavily fertilized with nitrogen, phosphorus and potassium. Check analyses showed that the pH values varied between 6 and 7 approximately (increasing slightly with time) whilst the contents of phosphorus and potassium in the soil were high and fairly constant in all treatments. The water supply was maintained at a constant level during all three years. Total contents of nitrogen, phosphorus, potassium, copper and manganese were determined in the ripe crops (barley); (cf. tables Ia, Ib, Ic).

In the treatments without copper, symptoms of copper deficiency were typical and very severe; the severity of the symptoms gradually decreased with increasing yields (and increasing copper applications) disappearing at a dry matter production of about 80 g per pot. The amount of copper applied varied greatly, causing a considerable variation in production of dry matter (cf. abcissa values, fig. 4). The fully drawn curves show, for all three years, the average relationship between relative copper content and production of dry matter per pot, for grain, straw and grain + straw. For the individual years, the main course of the curves is the same as that for the average curves.

The curves obtained after the application of greatly varying quantities of copper sulphate were also found to follow the same

TABLE Ia

Copper additions and percentage contents of various plant nutrients, average 1939–41
Grain

Copper added in g:		In dry matter					g dry matter per pot
		% N	% P	% K	p.p.m. Mn	p.p.m. Cu	
No treatment		2.90	—	0.60	—	3.2	0.1
Chalcopyrite I *)	0.56	3.57	0.53	0.67	33	5.4	4.6
,, I	2.79	2.58	0.54	0.77	31	3.2	48.4
Chalcocite and bornite II †)	0.52	—	—	—	—	0.7	0.1
Chalcocite and bornite II	2.59	—	—	—	—	6.9	0.3
Chalcocite and bornite I	0.52	3.00	0.52	0.72	30	3.0	29.3
Chalcocite and bornite I	2.58	2.21	0.43	0.60	29	4.5	50.7
Malachite II	2.50	3.55	0.60	0.78	30	4.2	6.8
,, I	0.47	2.13	0.40	0.60	25	4.4	51.5
,, I	2.34	2.03	0.39	0.57	19	5.4	53.2
$CuSO_4.5H_2O$	0.03	3.77	0.62	0.77	38	4.3	2.4
,, ,,	0.13	2.76	0.49	0.64	23	2.5	34.7
,, ,,	1.02	2.14	0.42	0.56	26	4.7	54.4

*) I refers to very finely ground mineral (see [3]).
†) II refers to coarsely ground mineral (see [3]).

TABLE Ib

Copper additions and percentage contents of various plant nutrients, average 1939–41
Straw

Copper added in g:		In dry matter					g dry matter per pot
		% N	% P	% K	p.p.m. Mn	p.p.m. Cu	
No treatment		2.93	0.33	0.60	189	16.6	8.3
Chalcopyrite I *)	0.56	2.07	0.37	1.52	129	8.5	47.8
,, I	2.79	0.81	0.09	1.50	98	12.5	49.5
Chalcocite and bornite II †)	0.52	2.59	0.49	1.16	225	14.4	10.4
Chalcocite and bornite II	2.59	2.83	0.54	1.57	163	11.0	24.1
Chalcocite and bornite I	0.52	1.22	0.19	1.46	85	9.4	50.6
Chalcocite and bornite I	2.58	0.85	0.07	1.51	87	13.1	45.9
Malachite II	2.50	1.90	0.37	1.51	102	8.3	51.6
,, I	0.47	0.77	0.07	1.33	93	11.0	47.3
,, I	2.34	0.79	0.07	1.30	81	13.4	50.0
$CuSO_4.5H_2O$	0.03	2.04	0.39	1.49	118	9.6	42.8
,, ,,	0.13	1.23	0.19	1.46	99	9.3	49.7
,, ,,	1.02	0.78	0.08	1.46	91	10.9	47.3

*) I refers to very finely ground mineral (see [3]).
†) II refers to coarsely ground mineral (see [3]).

TABLE Ic

Copper additions and percentage contents of various plant nutrients, average 1939–41
Grain + straw

Copper added in g:	In dry matter					g dry matter per pot
	% N	% P	% K	p.p.m. Mn	p.p.m. Cu	
No treatment	2.95	0.33	0.60	187	16.6	8.4
Chalcopyrite I *) 0.56	2.16	0.38	1.47	123	8.3	52.4
,, I 2.79	1.66	0.31	1.15	66	7.8	97.9
Chalcocite and bornite II †) 0.52	2.59	0.49	1.16	225	14.3	10.5
Chalcocite and bornite II 2.59	2.83	0.54	1.57	163	10.9	24.4
Chalcocite and bornite I 0.52	1.78	0.29	1.23	68	7.1	79.9
Chalcocite and bornite I 2.58	1.56	0.26	1.03	57	8.6	96.6
Malachite II 2.50	2.02	0.39	1.46	97	7.9	58.4
,, I 0.47	1.49	0.25	0.94	57	7.6	98.8
,, I 2.34	1.44	0.23	0.92	48	9.3	103.2
$CuSO_4.5H_2O$ 0.03	2.09	0.40	1.47	116	9.2	45.2
,, ,, 0.13	1.78	0.30	1.16	71	6.4	84.4
,, ,, 1.02	1.51	0.26	0.98	56	7.2	101.7

*) I refers to very finely ground mineral (see [3]).
†) II refers to coarsely ground mineral (see [3]).

course both for the average values as well as for individual years.

The three dotted curves at the bottom of figure 4 (all curves are drawn freehand) show the average relationship between percentage content of nitrogen in grain in straw and in grain + straw, and the corresponding production of dry matter per pot. This relationship was repeatable for each of the three years. When grain formation sets in, the yield of straw is slightly reduced and at the same time the percentage nitrogen content in the straw is reduced. The same is found for phosphorus, both for the average and for individual years, but not so in the case of potassium or manganese. The relative content of these elements both in the total yield and the particular fractions of the yield gradually decreases with increasing yield for each of the three years.

For grain, as well as for straw and grain + straw, it will be seen that the relative copper content may be the same for very different yield values. If, in this case therefore, only a single sample was taken from a copper deficient crop and its relative copper content determined, a very high copper content might be found. If two samples

were taken, one from a small copper deficient crop, the other from a somewhat bigger crop where the copper deficiency is not so marked, there would be a possibility of finding the latter crop having the lowest copper content.

If samples of such crops are handed in for chemical analysis, the

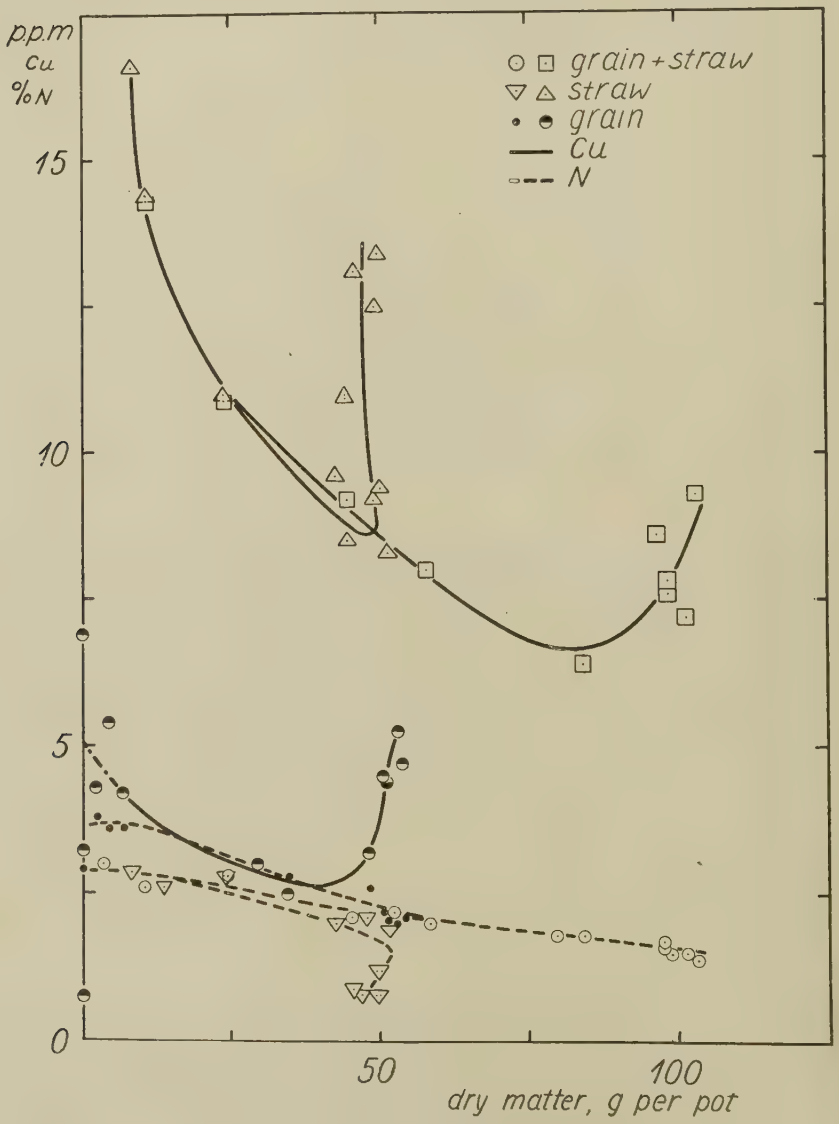


Fig. 4. Dry matter and the relative content of plant nutrients.

information on yield and the appearance of deficiency symptoms may be lacking or inaccurate — hence it may be necessary to analyse the crop not only for copper but also for a number of other plant nutrients.

If as in the present case, the total crop, the straw and the grain, were analysed for copper, nitrogen, phosphorus, potassium and manganese and if three crop samples were received — one from a crop with a very small dry matter production, another from a crop of about 80 g dry matter and the third from a crop of about 105 g dry matter per pot — the percentage contents as far as potassium and manganese were concerned would be found to decrease steadily from the smallest to the biggest crop. This, however, would not be the case for copper where we should find first a decrease and then an increase in its relative content as the yield of grain, straw or grain + straw increased. For nitrogen and phosphorus the results, as stated above, would be slightly different but only so far as the straw is concerned, where, for the same value of crop yield, slightly differing percentage contents *may* be found (see figure 4).

These results indicate that:

(1) If a series of results were obtained in which the relative nutrient content in the above-ground parts of the crop first decreased and then increased with increasing yield then according to interpretation II this would indicate severe deficiency in the particular plant nutrient concerned *where the dry matter production is lowest*. When the other plant nutrients (in this case N, P, K and Mn) are applied in sufficient and constant quantities, their percentage contents will on the whole progressively decrease with increasing yields. (The samples are taken close to each other in the field).

(2) A heavily declining percentage copper content with increasing yield and *slightly* decreasing percentage contents of nitrogen, phosphorus, potassium and manganese indicate a severe copper deficiency in the crop where the plants are smallest (lowest dry matter production). Other presuppositions as under (1).

(3) A greatly increasing percentage copper content with increasing yield and *slightly* decreasing percentage contents of nitrogen, phosphorus, potassium and manganese, indicate a copper deficiency in the crop where the plants are smallest (lowest dry matter production). Other presuppositions as under (1).

In previous works 3), 4) these problems have been dealt with

for plant nutrients other than copper (see also Poulsen [2]). The form of the curve representing the relative nutrient content of the plants, as has been observed for copper (fig. 4), may be explained by the fact that the production of supporting tissue and starch by the plants, especially by grasses, increases more rapidly than the absorption of nutrients during the initial stages of uptake of copper from the soil until the point of inflexion is reached (cf. fig. 3*d*). From this point the formation of supporting tissue and starch cannot keep pace with the absorption of copper as the rate of application of this element is increased. The point of inflexion in fig. 3*d* corresponds with the three minima for relative copper content shown in fig. 4 (one for grain, one for straw and one for grain + straw).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

According to experience gained in this laboratory, the observation of the *S*-shaped yield curve (fig. 3d) appears to depend upon the severity of the absolute deficiency of the nutrient in question, in this case copper. In those soils where this deficiency is not so pronounced, only that part of the curve to the right of the point of inflexion will presumably be observed which means that we shall find increasing relative nutrient contents with increase in dry matter production (increasing applications of the particular nutrient).

It is however possible that the observation of the *S*-shaped curve is influenced by other factors. A crop which has a high capacity for absorbing copper, even from soils deficient in this element, will, in such investigations, give the impression that we have a soil relatively rich in copper i.e. we shall only observe that part of the curve to the right of the point of inflexion (fig. 3d). Finally it is also possible that heavy and uniform applications of other plant nutrients (and water) might in some cases contribute towards the production of an *S*-shaped curve (relative deficiency of Cu).

Our knowledge of such problems is still incomplete. The present investigation indicates that in order to make the fullest use of chemical plant analyses for diagnostic purposes, these problems must be thoroughly investigated. To this end pot experiments carried out in the first instance according to a simple factorial plans, should prove useful. The proper design of such experiments, however, is of great importance.

As mentioned in the beginning, investigations of this kind will increase our knowledge of important fundamental problems relating to fertilizing techniques. The aim of these investigations should not be the establishment of new yield equations. These have always been of secondary importance being merely of an empirically descriptive nature, though it must be admitted they may not be without interest from the point of view of fertilizing technique.

The essential point is an increased knowledge of the flexibility and position of the yield curve in the co-ordinate system under different conditions, the conditions here being classed under four main groups of factors. In practice it becomes a question of determining interactions between factors affecting dry matter production or the flexibility of the yield curves under different growth conditions. From the point of view of fertilizing technique, it is extremely important to elucidate more thoroughly these interactions or this flexibility not only with regard to the interpretation of chemical plant analyses but also with regard to the interpretation of chemical soil analyses and for instance the distribution of fertilizers to the crops etc.

Received July 22, 1950.

LITERATURE

1) Goodall, D. W. and Gregory, F. G., Chemical composition of plants as an index of their nutritional status. Imp. Bur. of Horticulture and Plantation Crops. Tech. Com. No **17**, 1947.

2) Poulsen, J. F., Studier over forskellige fosfaters gødningsværdi. Om stofproduktionen og optagelsen af fosfor fra forskellige fosforgødninger. III. (Studies on the fertilizing value of different phosphates. On the production of dry matter and the absorption of phosphorus from different phosphate fertilizers. III.) Tidsskrift for Planteavl, **53**, 413, 1950.

3) Steenbjerg, F., Kobber i Jord og Kulturplanter. II. Undersøgelser over Kobbermineralers Gødningsværdi. (Copper in Soils and Cultivated Plants. II. Investigations on the Fertilizing Value of Copper Minerals.) With a summary in English. Tidsskrift for Planteavl, **47**, 557, 1943.

4) Steenbjerg, F., Om kemiske Planteanalyser og deres Anvendelse. (On Chemical Analyses of Plants and Their Use.) With a summary in English. Tidsskrift for Planteavl, **49**, 158, 1945.

Plant and Soil III, no. 2 April 1951

DIE BEDEUTUNG DER BODENOBERFLÄCHE FÜR DIE HUMUSBILDUNG

G. W. HARMSEN

Aus der Bodenkundlichen Forschungsstelle der Zuidersee-werke, Kampen, Holland.

Es ist gegenwärtig Gemeingut geworden, dass die Nutzung des Bodens als Acker die Neigung hat dessen Humusgehalt herabzusetzen. Allerdings ist diese Erkenntniss erst in letzter Zeit voll gereift, während man zu Beginn der Entwicklung der wissenschaftlichen Bodenlehre diese Tendenz nicht sah. Einerseits war die Nutzung des Ackers damals nämlich viel weniger intensiv und war man für die Zufuhr der elementaren Pflanzennährstoffe eben angewiesen auf den Stalldünger, wodurch meistens mehr organische Stoffe dem Boden zugeführt wurden als gegenwärtig, anderseits aber war die Kultur der jungfräulichen Böden in den sich schnell entwicklenden Steppengebieten Russlands und Amerikas damals noch nicht weit genug vorgeschirtten und noch gar zu jung um das nötige, wissenschaftlich gewertete, Material geliefert zu haben. Seit der Entwicklung der modernen intensieven Arbeitsmethoden und hauptsächlich seit dem Steigen der Kunstdüngergaben aber wurde der allmähliche Rückgang des Humusgehaltes immer augenfälliger, sogar in den alten Ländern Europas, wo die Äcker bereits seit Jahrhunderten der landwirtschaftlichen Nutzung unterliegen. Viel auffallender und stürmischer verlief dieser Process aber in den jungen, erst seit Jahrzehnten kultivierten, Steppengebieten. Das Schrifttum hierüber ist bereits recht umfangreich geworden; im Ramen dieser kurzen Mitteilung ist es aber nicht möglich diesem gesammten Material näher zu treten. Nur einige Beispiele seien hier kurz erwähnt um damit die Grössenordnung des Humusabbaues in Steppenböden bei normalem Akkerbau anzugeben.

Als erstes Beispiel sei erwähnt die gediegene und sich auf viele

Jahre erstreckende Arbeit von Miller und seinen Mitarbeitern, späterhin hauptsächlich weitergeführt von Jenny [32] [18]). Beim Vergleich zweier, übrigens in jeder Hinsicht vergleichbaren, Parzellen auf dem typischen Steppenboden — dem „Putnam silt loam" — in der Calloway County in Missouri, wovon die eine um 1865 in Kultur genommen war, die andere dagegen nie gepflügt, doch stets als Grassland genutzt worden ist, erwies es sich, dass der durchschnittliche Gehalt an Humus im Laufe der ca. 60 Kulturjahre von 3,66% (2,1% organischen Kohlenstoffs) heruntergegangen ist auf 2,26% (1,3% organ. Kohlenst.). Also ein Rückgang von 38%. Beinahe eben so bedeutend war auch die Abnahme des gesammten Stickstoffs, nähmlich um 34,5% des ursprünglichen Gehaltes. Allerdings war für diese gewaltige Verarmung des Bodens teilweise verantwortlich eine recht einseitige Fruchtfolge, die kaum etwas anderes umfasste als Halmfrüchte; dabei wurde weder Kunstdünger, noch Stallmist angewant, was in den dortigen Ackerbaubetrieben aber Regel ist.

Als zweites, sehr lehrreiches Beispiel sei die Arbeit von Newton und Mitarbeitern in den Steppengebieten des westlichen Canadas erwähnt [2] [1] [34]), wobei sie ihre jahrelangen Untersuchungen über das gesammte Steppengebiet Canadas ausdehnten. Auch hier wurden so viel als möglich vergleichbare Probenpare untersucht, wobei die eine Probe einem kultivierten Acker, die andere einer mit dem ersten vergleichbaren unkultivierten Steppen-Parzelle entstammte. Die Kulturdauer war hier aber weit kürzer als in Missouri und variierte von 10 bis 30 Jahren. Doch fanden Newton c.s. bereits nach einer so kurzen Frist durchschnittliche Rückgänge von organischem Kohlenstoff und Gesammtstickstoff von 20 bis 30, bezw. 15 bis 20%. In den ältesten, als Acker genutzten, Parzellen konstatierten sie sogar Verluste von 50% und mehr C und von ca 40% N.

Schliesslich sei hier noch kurz hingewiesen auf die Untersuchungen von Kardos [22]), der mit Hilfe von Lysimeter-Studien die Stickstoffverluste aus bearbeitetem Boden verglich mit denjenigen bei ständiger Grassbedeckung, und der auch beängstigende Unterschiede nachwies.

Beim Beurteilen dieser gewaltigen Verluste an Humus, darf man allerdings nicht vergessen, dass das Tempo des Humusabbaues nicht das selbe bleibt bei einer fortgesetzten Nutzung des Bodens als Acker. Die ersten Jahre der Kultur auf eben urbar gemachten Böden

weisen immer die schnellste Aufzehrung der organischen Substanz auf. Je länger die Kultur dauert, des to langsamer geht der Humusabbau vor sich, so dass man auf die Dauer einem Gleichgewicht zustrebt, allerdings einem Gleichgewicht auf einem viel niedrigeren Niveau als dem ursprünglichen des noch jungfräulichen Bodens. Die oben zitierten Publikationen weisen auch auf diesen Umstand, und eine statistische Arbeit von J e n n y [19]) behandelt den Rückgang des Gesammtstickstoffgehaltes der Steppenböden Amerikas in breiterem Verbande, wobei er während der ersten 10 Kulturjahre einen Rückgang von ca. 17% findet, im Laufe der nächsten 10 Jahre einen weiteren von 8%, und so immer weiter abnehmende Abbaugeschwindigkeiten bis zu bloss 3 bis 4% für die Zehn-Jahres-Dauer vom 50-en bis zum 60-en Kulturjahre. Träte solch eine allmähliche Verlangsamung des Humusabbaues nicht ein, dann würden die meisten Gebiete der Erde bereits erschöpfend ausgenutzt sein und wäre keinerlei Ackerbau da mehr möglich.

Dieser allgemeinen Tendenz zu einem neuen Gleichgewicht bei anhaltender Kultur ist es auch zu verdanken, dass in den meisten alten Ackerbaugebieten, u. a. in Europa, seit dem Aufkommen der wissenschaftlichen Bodenkunde, kaum noch augenfällige Humus-Rückgänge gefunden werden. Die Verarmung des Bodens an Humus hat in all diesen, meistens seit Jahrhunderten bebauten, Böden schon längst statt gefunden, sodass man jetzt keinen weiteren Rückgang mehr erwarten kann. Allerdings wurden auch in Europa im Laufe der letzten Dezennien recht viel ungenutzte Flächen urbar gemacht und schreitet dieser Prozess auch heutzutage noch fort, die meisten hierbei gewonnenen Äcker gehören aber speciellen Bodentypen an: es sind entweder Mohre oder arme und unfruchtbare Sande, also Bodentypen, worauf früher kaum lohnender Ackerbau möglich war. Im ersten Falle ist der Boden dann aussergewöhnlich humusreich, sodass eine Verbrennung von sogar mehr als 50% davon kaum ein Nachteil genannt werden kann. Im zweiten Falle dagegen geht man eben von ausgesprochen humusarmen Böden aus, worin eigentlich kaum noch ein Rückgang möglich ist. Solche Böden müssen denn auch mit einem kolossalen Aufwand an Arbeit und Kosten durch speziale Massnahmen humusreicher gemacht werden. In allen mehr oder weniger normalen fruchtbaren Böden Europas hat sich der Prozess des Humusabbaues aber schon vollzogen zu einer Zeit als man diesen Prozess nicht als solchen er-

kennen konnte und also auch schon zu einer Zeit, wo es keinen Kunstdünger gab, sodass man so viel als möglich Stalldünger anwenden musste. Durch die geringeren Erträge und den allgemeineren Gebrauch des Stalldüngers verlief der Humusabbau damals gelinder und weniger schmerzhaft. Diese Faktoren konnten aber nicht verhüten, dass der Humus bis auf das neue stationnaire Gleichgewicht aufgezehrt worden ist.

Nur in einigen spezialen Fällen entstehen bis auf den heutigen Tag noch gute fruchtbare und relativ humusreiche Böden im Busen des alten Europa. Das sind die aufschlickungen an den Wattenküsten. Sobald solche Schlicke oder Groden genügend gereift sind werden sie bedeicht und in Kultur genommen. Hierdurch verfügt man heutzutage über alle denkbaren Altersstufen von solchen Böden und nun erweist es sich beim Vergleich der verschiedenen Parzellen, dass diese Marschböden meistens am humusreichsten sind im Augenblick der Bedeichung und dass ihr Humusgehalt danach stets zurückläuft [27]) [16]).

So kann man also annehmen, dass auch in Europa der Humusvorrat der meisten Böden seit ihrer Urbarmachung stark in Anspruch genommen ist. Dass hierdurch keine katastrofalen Erosionen stattgefunden haben, verdankt man teilweisen den spezialen Umständen im Kleinbetrieb, teilweise aber dem humiden und milden Klima Europas, während die Dichtheit unserer Bevölkerung und das Emporkommen der Industrie dafür gesorgt haben, dass der Ackerbau auch auf unseren an Humus verarmten Böden noch lohnend ist.

Mit dem Reifen der allgemeinen Erkenntnis, dass der natürliche Humusgehalt in beinahe allen Ackerböden in allen Klimagebieten rückläufig ist oder bereits bis auf ein Minimum zurückgegangen ist, und dass damit die Böden in mancher Hinsicht ihre wertvollen Eigenschaften verlieren, hat eine Fülle von Untersuchungen und Arbeiten ausgelöst, deren Ziel es ist Wege zu finden um diesem Aufzehren der Humusvorräte entgegen zu arbeiten. Die meisten vorgeschlagenen Massnahmen propagieren eine erhöhte Zufuhr von organischer Substanz zum Boden, sei es als Stalldünger, Kompost und dergleichen Abfallstoffe, oder als Gründüngung und als Ernterückstände (lange Stoppel, Kompostiertes oder frisches Stroh, u.d.g.) oder sie wollen eine Humusanreicherung erzwingen durch

eine zielgemässe Fruchtfolge mit so viel als möglich Gründüngergewächsen- und Leguminosen-Anbau. Es hat sich denn auch eine sehr grosse Litteratur hierüber angesammelt, die hier aber wiederum nicht näher behandelt werden kann. Bloss einige repräsentative Arbeiten können im Laufe der weiteren Erörterungen zitiert werden.

Die Erfolge der vorgeschlagenen Massnahmen waren sehr variabel. Alle Abstufungen von absoluten Misserfolgen bis zu deutlichen und glänzenden Erfolgen findet man zwischen den vielen Publikationen auf diesem Gebiet, was ja auch begreiflich ist im Hinblick auf die Fülle von verschiedenen Umständen, worunter die Versuche durchgefürt wurden. Wie einen roten Faden kann man aber zwischen allen diesen Arbeiten die Erkenntniss verfolgen, dass es auf Ackerböden eine sehr schwere Aufgabe ist einen hohen natürlichen Humusgehalt zu erhalten oder gar einen ungenügenden Humusgehalt zu erhöhen. Auf nicht zu sauren und genügend entwässerten Böden erwies es sich allerdings stets möglich durch sehr hohe Gaben von organischem Material den Humusgehalt merkbar zu erhöhen, so wie es in Gärten und beim intensiven Gemüsebau auch tatsächlich öfters geschieht. Meisstens ist das aber nur möglich bei einem so hohen Aufwand an Kapital und Arbeit, dass es sich eben nur für Gartenbau eignet, während der Ackerbau diese Investierungen nicht aufzubringen vermag.

Sehr zahlreich sind die Arbeiten zur Prüfung der Notwendigkeit von Stallmistgaben neben oder anstatt Kunstdünger. Diese Frage ist hauptsächlich von Bedeutung in Gebieten mit intensiver Landwirtschaft und viel Viehzucht, wo man hohe Gaben von Stallmist anwenden kann. Eine Übersicht dieses Problems gab Lemmermann [25]) im Jahre 1932. Sein Urteil über eine einseitige Anwendung von Mineraldüngern ist sehr mild, da er nur Arbeiten in Deutschland und angrenzenden Ländern überblickend, zur Schlussfolgerung kommt, dass eine einseitige Anwendung von Mineraldüngern wohl auf die Dauer zur Verarmung des Bodens führt, eine Anwendung von Stallmist aber auch keine auffallende Verbesserung mit sich bringt und nur bei sehr hohen Gaben auf die Dauer den Boden gewissermassen günstig beeinflusst. Dieses, für die meisten West-Europäischen Untersuchungen über den Bodenverbessernden Wert des Stallmistes charakteristische Urteil, wird besonders scharf zum Ausdruck gebracht in den Mitteilungen von Meyer [30]) [31]) über Versuche auf verschiedenen, meist sandigen, Böden in Holland,

wobei mit einander verglichen wurden Objekte mit Stalldünger mit Mineraldüngern und ohne jegliche Düngung. Die Ergebnisse der meisten Versuche haben nämlich erwiesen, dass der Humusgehalt der holländischen sandigen Böden kaum verändert wird weder durch regelmässige Stallmist-Düngung, noch durch einseitige Kunstdüngergaben oder gar durch das, nachlassen jeglicher Düngung. Auch leidet die allgemeine Fruchtbarkeit oft kaum unter jahrenlanger Raubwirtschaft ohne jegliche Düngung. Allerdings liefern diese Böden gute Erträge nur bei sehr reichlicher Düngung mit Stallmist oder Mineraldüngern. Nach einem 16 Jahre langen Enthalten jeglicher Düngung genügte es aber éinmal tüchtig zu düngen um wieder durchaus normale Ernten zu erzielen. In solchen Böden scheint sich also das Gleichgewicht eines alten Ackerbodens schon gänzlich eingestellt zu haben. Alle frischen organischen Substanzen (Stallmist, Enterückstände, u.s.w.) werden alljährlich restlos zersetzt, der alte Dauerhumus dagegen ist sehr widerstandsfähig geworden und unterliegt keinem merkbaren Abbau mehr. Letzterer funktionniert daher auch bloss als Adsorbtionscomplex, liefert aber keine Pflanzennährstoffe mehr durch seine Mineralisation. Hier ist man also angelangt beim sehr stabilen Gleichgewicht alter Kulturböden, wo aller abbaubare Humus restlos mineralisiert ist, und wo man also das Humus- und Fruchtbarkeits-Minimum erreicht hat. Eine weitere Nutzung solcher Böden als Acker ist entschieden möglich und bei den in dichtbevölkerten Gebieten herrschenden ökonomischen Umständen auch lohnend. Man darf aber nicht vergessen, dass dies immerhin ein ungünstiger und künstlicher Zustand ist, wobei man sich also stabilisiert hat auf dem niedrigsten Niveau der Rentabilität. Man muss eben höhere Düngergaben und mehr Arbeit investieren zum Erhalten von hohen Erträgen als auf demselben Boden vor seiner Erschöpfung notwendig gewesen wäre. Bei einer Änderung der ökonomischen oder politischen Lage kann es sich erweisen, dass der Ackerbau auf solchen Böden dann plötzlich nicht mehr lohnend ist.

Die für den, in dieser Mitteilung entwickelten, Gedankengang wichtigste Schlussfolgerung aus den soeben zitierten Arbeiten ist aber der geringe Wert des Stalldüngers für die Erhaltung des Humusgehaltes. Obgleich der Humus in diesen Böden weitgehend abgebaut ist, gelingt es kaum neuen Humus auf zu bauen aus Stallmist oder anderen organischen Düngern.

Ein anderes sehr demonstratieves Beispiel der Unmöglichkeit den Humusgehalt im Ackerboden durch Stallmist zu erhöhen gibt S i e g e l in seiner Mitteilung über die s.g. ,,Filder" bei Stuttgart [38]). In diesem leichten Boden hat eine sehr exklusive Arbeitsweise, wobei schon seit ca. 700 Jahren ganz gewaltige Stallmistgaben von durchschnittlich 70.000 kg/ha pro Jahr verabreicht werden, nicht vermocht den Humusgehalt merkbar zu erhöhen. S i e g e l kommt denn auch zur Schlussfolgerung, dass unter den Umständen des Ackerbodens eine Erhöhung des Humusgehaltes kaum möglich ist. Geht man von einem ,,toten", also so gut wie humuslosen, Boden aus, dann kann man anfänglich eine gewisse Steigerung des Humusgehaltes erreichen durch sehr üppige organische Düngung; recht bald stellt sich aber schon auf verhältnissmässig niedrigen Niveau das ,,Ackerboden-Gleichgewicht" ein. Geht man dagegen von einem jungfräulichen und humusreichen Boden aus, dann kann man sogar einen Rückgang des Humusgehaltes im Acker nicht verhindern durch erschwingliche organische Düngung. Auf die Dauer gelangt man auch dann also zu demselben niedrigen Gleichgewicht, das charakteristisch ist für jegliche städige Nutzung des Bodens für Ackerbau.

In den alten Kulturländern Europas und Asiens haben schon recht viele Böden diesen Zustand des ,,Alten Ackerboden-Gleichgewichtes" erreicht, wodurch es sich auch erklärt, warum starke Rückgänge im Humusgehalt da nicht mehr vorkommen und man es sich erlauben kann sehr hohe Mineraldüngergaben zu verabreichen zum Erzwingen hoher Ernten, ohne merkbare weitere Schädigung des Bodens. Ganz anders liegen die Verhältnisse aber in den noch relatief jungen Ackerbaugebieten Amerikas, Afrikas und Australiens, wo man auch heute noch mit geringer Düngung verhältnissmässig hohe Erträge erzielen kann. Ein Teil der Pflanzenernährung entstammt da also dem Humusvorrat. Ein ständiger Rückgang des Humusgehaltes ist eine logische Folge dieses Zustandes. Anfänglich kümmerten die Siedler in diesen Gebieten sich nicht um die Verarmung des Bodens. Als aber die bedauerlichen Folgen des Raubbaues immer deutlicher sichtbar wurden, erwachten in den jungen Ländern nicht nur die Farmer, sondern auch die verantwortlichen Behörden und die Wissenschaftler, und mehr und mehr Arbeiten wurden dem Studium dieser Frage gewidmet. So entstand eine sehr umfangreiche Litteratur hierüber.

Grosse Mengen von Stalldünger fehlen in den Steppengebieten mit ihrem einseitigen Getreidebau allerdings. Eine erhöhte Zufuhr organischen Materials zum Boden muss also hauptsächlich gesucht werden in einer sparsamen Behandlung des Stroh's, das so viel als möglich auf dem Acker belassen werden muss, und in einer richtigen Fruchtfolge. Dass man auf diesem Wege auch tatsächlich viel erreichen kann, geht eindeutig aus den vielen Arbeiten hervor. Aber auch hierbei ertönt ganz monoton die Klage, dass sogar die zweckmässigste Bodenpflege und die beste Fruchtfolge nicht im Stande sind dem Humusabbau gänzlich vorzubeugen. Von den vielen, oft sehr lesenswerten Publikationen hierüber seien nur einige erwähnt:

J e n n y [20]) warnte bereits im Jahre 1930, dass zahlreiche Amerikanische Untersuchungen festgestellt haben dass .... „die Fruchtbarkeit jungfräulicher Böden durch Kultivierung rasch zurückgeht. Nach vielen Analysen von Steppenböden der nordwestlichen Weizengebiete sinkt der mittlere Stickstoffgehalt während 20 bis 40-jähriger Raubwirtschaft um 30 bis 50%". .... Er dringt daher an auf eine radikale Änderung des Wirtschaftssystems vom einseitigen Getreidebau zu gemischten Betrieben mit so viel als möglich Kunstweiden und Leguminosenanbau.

Einige Jahre später veröffentlichten S a l t e r und G r e e n [35]) die Ergebnisse ihrer Versuche in Ohio über die Abnahme von Kohlenstoff und Stickstoff im Boden bei verschiedenen Fruchtfolgesysthemen. Wiederum konnten sie sehr deutliche Unterschiede nachweisen, weshalb sie auch den einseitigen Mais- oder Weizen-Anbau verurteilen und kompliziertere Fruchtfolgen mit viel Kunstweiden anbefehlen. Aber sogar die besten Systheme konnten die Bodenverarmung nur verzögern.

Unter den Amerikanischen Veröffentlichungen der letzten Jahre fällt hauptsächlich die sehr gründliche Arbeit von C h i n g K w e i L e e und B r a y [3]) auf, die auf Versuchsfeldern in Illinois feststellen konnten, dass durch eine zweckmässige Fruchtfolge und durch das Belassen allen Stroh's auf dem Felde, der Rückgang des Humusgehaltes stark verzögert werden kann, dass man ihn bei einer Nutzung des Bodens als Acker aber nie ganz unterdrücken kann. Während einer 10-jährigen Versuchsdauer war der Humusgehalt um maximal 20% zurückgegangen, abhängig von der Wirtschaftsweise.

Sehr alarmierende Humuszehrung wurde, wie bereits erwähnt,

von Newton c.s. [2] [1] [34]) gemeldet in den canadischen Steppengebieten. Auch sie fanden dabei sehr ausgesprochene Unterschiede, abhängig von der gefolgten Fruchtfolge, aber, abgesehen von den Fällen, worin mehr als die Hälfte der Bodenoberfläche mit Luzerne bestellt war, konnte ein gewisser Rückgang des Humusgehaltes stets nachgewiesen werden.

Das Prinzip, dass nämlich, abgesehen von ökonomisch unerschwinglichen Gaben, im Ackerboden bei keiner einzigen Arbeitsweise ein hoher Humusgehalt erhalten bleiben kann, scheint demnach sehr allgemeingültig zu sein. Nicht nur in den alten Kulturböden der gemässigten Zonen ist es nachgewiesen worden, sondern auch in den Steppenböden und ebenfalls, und vielleicht sogar extrem ausgebildet, in dem kultivierten Boden der humiden Tropen. Sagte denn schon der Kenner der tropischen Böden Mohr [33]), dass .... „In den humiden warmen Tropen mit mittleren Temperaturen von 25° C und darüber, kann sich in genügend aerierten Böden kein Humus behaupten, geschweige denn sich anhäufen"....

Während man also im allgemeinen annehmen kann, dass beim Ackerbau die Humus-zehrenden Tendenzen überwiegen, sodass in allen ursprünglich humusreichen Böden der Humusgehalt anfänglich zurückläuft und sich dabei erst auf recht niedrigem Niveau Gleichgewichte einstellen, sieht man in analogen Böden und in ähnlichen klimatischen Umständen auf nicht genutzten Flächen ,auf Wiesen und in Wäldern — überall Bildung und Anhäufung von Humus, oft in vorzüglicher resistenter Form des echten Dauerhumus. Dieser prinzipielle Unterschied muss entschieden eine allgemeingültige Begründung haben; er kann nicht bloss eine Folge zufälliger und örtlich variabeler Faktoren sein. Worin unterscheiden sich aber Äcker von Wiesen, Steppen und Wäldern? Man kann natürlich viele Unterschiede anführen, die sich aber meistens nur auf die eine oder die andere Pflanzenassociation beziehen, selten aber allgemeingültig sind. So sind die Unterschiede in den Lebensbedingungen im Walde der humiden gemässigten Zone einerseits und einer ariden Steppe andererseits sehr augenfällig und doch trift man in beiden Fällen eine aktieve Humusspeicherung an, während auf derselben Steppe und in demselben Walde, sobald sie gepflügt und bestellt werden, sogleich eine schnelle Humuszehrung einsetzt.

Nur einige Faktoren können angeführt werden, die allen Ackerbauflächen gemein sind, den Wiesen, Steppen und Wäldern aber

fehlen: An erster Stelle ist es die regelmässige Bearbeitung des Bodens, wodurch die Ackerkrume alljährlich oder doch sehr oft immer wieder gekehrt und gemischt wird. Es kann sich dabei also keine rechte Bodenoberfläche ausbilden, worauf alle oberirdischen absterbenden Pflanzenrückstände sich ansammeln und einen Auflagehumus bilden. Ein zweiter Faktor, worin sich nicht nur die Äcker sondern alle genutzten Bodenflächen von ungenutzten unterscheiden, ist eben die Nutzung, also die regelmässige Abfuhr mineraler Bestandteile des Bodens mit der Ernte, wodurch die Gefahr einer allmählichen Verarmung des Bodens gegeben ist. Und als dritter Faktor kann angefürt werden, dass beim Ackerbau durchschnittlich geringere Mengen organischer Substanz dem Boden verbleiben als in Wäldern oder auf den Steppen und Wiesen.

Sonderbarerweise ist auf den ersten Faktor in dem Schrifttum kaum hingewiesen worden, während man alle Schuld den beiden anderen Faktoren zuschreibt, obschon eben der erste Faktor derjenige ist, der unabwendbar mit dem Ackerbau verknüpft ist, die beiden anderen dagegen bei einer richtigen Arbeitsweise weitgehend abgeschwächt oder sogar gänzlich Kompensiert werden können. Sehr oft sieht man also die Neigung nicht der jährlich wiederkehrenden Bearbeitung des Bodens sondern dem Entzug von Pflanzennährstoffen durch die Ernte den Rückgang des Humusgehaltes zu zu schreiben. Diese bei ungenügender Düngung zuweilen tatsächlich sehr gefährliche Bodenerschöpfung ist aber etwas prinzipiell anderes als der Abbau des Humus im Boden, ist doch meistens gerade der resistenteste Teil des gesammten Humus (der Dauerhumus oder „Humus" *sensu strictu*) der an Pflanzennährstoffen reichste. Sehr humusreiche Böden können dagegen zuweilen sehr arm sein an Pflanzennährstoffen und anderen mineralischen Bestandteilen, während oft sehr humusarme Böden reich an diesen Stoffen sind. Ausserdem erwies es sich bei vielen Versuchen, dass man durch eine intensivere Mineral-Düngung dem Abbau des Humus nicht vorbeugen kann. Allerdings haben viele Forscher gefunden, dass eine reichliche Mineraldüngung den Rückgang der Humusgehalte verzögert [32] [18] [19] [25] [3] [12], verglichen mit mangelhafter Düngung oder mit einer Nutzung ohne jegliche Zufuhr von Mineralstoffen. Diese Tatsache muss aber auf Rechnung der durch die Düngung erhöhten Synthese von Pflanzensubstanz gebracht werden, also auf Rechnung eines üppigeren Wachtums von Stoppeln,

Wurzeln und Unkraut, wodurch mehr Pflanzenrückstände dem Boden einverleibt werden. Diese humussparende Wirkung der Mineraldüngung ist daher auch nur bei Feldversuchen wahrgenommen worden. Bei Gefässversuchen oder Laboratoriumexperimenten, wobei ganz genau dosierte Gaben organischer Substanz verabreicht werden, gestalteten die Ergebnisse sich genau in entgegengesetzter Richtung, was ja auch nicht verwunderlich ist: eine Chemosynthese organischer Substanz im Boden ist eben auch bei der üppigsten Mineralernährung nicht zu erwarten, eine verschnellte Mineralisation der Humusstoffe wird aber durch das Schaffen von für die Mikroben optimalen Bedingungen der Temperatur, Reaction, Lüftung, des Wassergehaltes und auch der Mineralstoffernährung immer ausgelöst. Allerdings ist eine erhöhte Synthese des echten Dauerhumus und eine Bildung der Humus-Mineralstoff-Verbindungen bei erhöhter Mineraldüngung nicht ausgeschlossen, sie kompensieren aber augenscheinlich nicht die verschnellte Mineralisation.

Ein, allerdings zu ganz anderen Zwecken angelegter, Versuch im Laboratorium der Versuchsstation für die Zuidersee-Werke in Medemblik kann das obengesagte illustrieren. In diesem Experiment wurden grosse, aus unglasierten harten Kacheln gemetzelte, offene Behälter von ca. $^1/_3$ m² Oberfläche und 60 cm Tiefe mit sehr grossen Bodenproben beschickt, wonach man letztere jahrelang verschiedenen Behandlungen unterwarf, den Boden aber ständig in optimaler Feuchtigkeit und bei einer Temperatur von 15–25° C haltend. Einige dieser Bodenproben erhielten organische Düngung, andere nicht, einige wurden mineralisch üppig gedüngt, andere erhielten überhaupt keine Düngung, sodass sie allmählich durch Mineralisation und Ausspülung der löslichen Produkte verarmten. Bemerkenswert ist es nun, dass die Mineralisation des Humus und der Rückgang des Humusgehaltes in allen untersuchten Böden weit schneller verlief in den regelmässig mineralisch gedüngten Gefässen als in den ungedüngten, wie es in Tabelle I für bloss einen der Böden — einen jungen schweren kalkhaltigen Marschboden aus dem Wieringermeerpolder (ohne organische Düngung) — wiedergegeben ist.

An und für sich wirkt Kunstdünger also eher Humus-zehrend als Humus-sparend; nur im Falle einer durch Mineraldüngung stark erhöhten Produktion von Pflanzenrückständen kann diese Wirkung neutralisiert werden.

Die andere oft als Erklärung angeführte Ursache für den Humus-

TABELLE I

Moment der Probenahme	Humusgehalte (organischer Kohlenstoff × 1,72)	
	Ohne Mineraldüngung	Mit Mineraldüngung
Zu Begin de sVersuches . . .	3.95	3.95
Nach 2 Jahren	3.45	3.30
Nach 5 Jahren	3.25	2.90
Nach 10 Jahren	3.15	2.55

Schwund im Ackerboden, während dieselben Böden als Wiesen, Steppen oder Wälder den Humus speichern, ist die bei der Kultur des Bodens viel geringere Menge organischer Stoffe, die jährlich dem Boden verbleiben. Die Forscher, die dieser Ansicht huldigen, dringen daher auch energisch darauf an mit allen Pflanzenrückständen so sparsam als möglich umzugehen und den grösst möglichen Teil letzterer auf dem Felde zu lassen und auch viel Gründüngung anzuwenden [32] [18] [2] [1] [34] [25] [35] [3] [12] [13] [17] [10]. Auch diese Erklärung trifft aber nicht zu, denn dieselben Autoren erkennen alle, dass man die Humuszehrung hierdurch allerdings weitgehend verringern, nie aber gänzlich unterbinden kann, sogar nicht durch Anwendung von Gaben organischer Stoffe, die weit höher sind als die, welche auf diesen Böden vor der Kultivierung anfielen, und die damals offenbar genügten zur Humusakkumulation. In einigen Fällen, so z.B. in den Urwäldern der humiden Tropen ist der jährliche Anfall organischer Substanz tatsächlich viel höher als auf demselben Boden unter den Bedingungen der Kultur [33], in den meisten Fällen aber trifft das sicherlich nicht zu. Die jährlich pro ha produzierte Menge organischer Trockensubstanz (ober- und unterirdischer) schwankt in den ungenutzten Steppen innerhalb weiter Grenzen, ist aber selten höher als 10.000 kg und durchschnittlich nicht höher als 7.000 kg. Eine gute Halmfrucht dagegen produziert entschieden wenigstens 10.000 bis 15.000 kg Trockensubstanz jährlich als Streu, Stroh, Stoppeln und Wurzeln, also ca. $1^1{}_2$ mal so viel, und doch konnte man in Versuchen, wobei diese gesammte Menge untergepflügt wurde, dadurch den Humusschwund nicht beheben. Im humiden gemässigten Klima West-Europa's kann man die durchschnittlichen Erträge an gesammter Trockensubstanz als Wurzeln, Stoppeln und organische Düngung auf dem Acker auf ca. 5000 kg stellen, während Dauerweiden, abwechselend als Heuschlag und als Weide genutzt, kaum mehr nämlich ca. 6000 kg ha produzieren und doch findet im

ersten Falle schnelle Humuszehrung, im zweiten Humusanhäufung statt.

Übersieht man also kritisch alle Umstände auf Äckern und vergleicht sie mit denen auf Wiesen, Steppen und Wäldern, dann wird es deutlich, dass eben die regelmässig wiederkehrende Bearbeitung des Bodens der prinzipielle Faktor ist, der verantwortlich ist für alle besonderen Eigenschaften des Ackerbodens. Es genügt sich bloss einzudenken in die Folgen des jährlichen Pflügens und Umbrechens des Bodens um zur Überzeugung zu kommen, dass der Mensch bei dieser Arbeitsweise einen prinzipiell neuen Zustand geschaffen hat und hierdurch erst wirklich den Boden „nutzt" als ein Substrat, das, wie in der Gärungsindustrie der Nährboden, völlig extrahiert und erschöpft wird. Dagegen ist die Nutzung des Bodens als gepflegter Wald oder sogar als intensief bewirtschaftetes Grasland bloss eine graduelle Abänderung des Zustandes in Urwäldern, bezw. auf natürlichen Wiesen und Steppen.

In einer gewissen Tiefe im Boden herrschen immer Umstände, wobei keine richtige Anhäufung von Humus möglich ist, während die Oberfläche des Bodens Humusakkumulation in sehr vielen Fällen ermöglicht. Dass in den meisten natürlichen Boden-Profielen der Humus nicht nur als Auflagehumus auf dem Boden liegt, sondern bis zu einer gewissen Tiefe im Boden vorkommt, ist keinesfalls ein Beweis für dessen Bildung in den tieferen Schichten. Der auf der Bodenoberfläche gebildete Humus hat eben unzählige Wege zur Wanderung bis in recht tiefe Schichten. Erstens ist da schon der mechanische Transport durch wühlende Säugetiere und Insekten, zweitens die Einspülung von humushaltiger Oberflächen-Erde durch Regenwasser in Risse und Wühlgänge, und schliesslich der Transport als wahre oder als colloidale Lösungen und als Suspensionen, wobei durch Ausflockungen zuweilen sogar Humusakkumulationen in bestimmten Schichten in grösserer Tiefe stattfinden (Podsol-Typus). In allen diesen Fällen ist es aber eben Transport bereits gebildeter resistenter Humusstoffe nach den tieferen Bodenschichten, nicht aber eine Bildung derselben in diesen Schichten, woran letztere ihren Humusreichtum verdanken.

Es ist ohne Weiteres nicht zu sagen, welche Faktoren den schnellen und restlosen Abbau der Pflanzenrückstände *im* Boden gegenüber einer verzögerten Mineralisation und einer damit einhergehenden Synthese des Dauerhumus *auf* der Bodenoberfläche bewir-

ken. Sehr wahrscheinlich ist es auch nicht ein oder einige Faktoren, sondern die Gesammtheit aller, die den fundamentalen Unterschied des Milieu's verursachen. Sowohl die Temperatur als die Feuchtigkeit sind eben in den tieferen Bodenschichten weitgehend nivelliert, während sie auf der Bodenoberfläche in allen Klima-Gebieten sehr schroffe Schwankungen aufweisen. Vielleicht noch wichtiger als die Höhe der absoluten Maxima und Minima dieser Grössen, ist die Frequenz der Schwankungen. Sogar in dem sehr milden und gemässigten Klima West-Europa's trocknet im Sommer bei sonnigem Wetter die Bodenoberfläche täglich bis zum lufttrockenen Zustande aus, nimmt aber im Laufe der Nacht genug Feuchtigkeit aus der Luft (als Tau) oder aus den tieferen Bodenschichten auf um wieder eine gewisse Lebenstätigkeit der Mikroben zu ermöglichen [14]). Im Frühjahr und Herbst herrschen oft Perioden, wobei man täglich Nachtfröste hat, die eben nur die Bodenoberfläche beeinflussen, die tieferen Schichten dagegen unberührt lassen. Bei böigem Wetter mit frequenten aber unbedeutenden Schauern wiederum wird die Bodenoberfläche zuweilen mehrere male pro Tag benetzt, trocknet danach aber immer wieder aus.

Dies alles sind Umstände, die das Leben der Mikroben auf der Bodenoberfläche sehr stark und ungünstig beeinflussen und immerwieder unterbrechen. Die schroffen Jahres-, Wetter-Perioden- und Tages-Schwankungen der Lebensfaktoren erschweren auf der Bodenoberfläche die Existenz der Kleinlebwesen bedeutend, wodurch ihre Funktionen stark gedrückt und teilweise in andere Bahnen geleitet werden. Auch wird hierdurch die Mikroflora einer strengen Auslese unterworfen, wodurch bloss gewisse Organismen, die im Stande sind unter ungünstigen Bedingungen ihre Tätigkeit ein zu stellen, bei einer günstigen Änderung aber sofort wieder weiter zu leben, auf der Bodenoberfläche sich zu behaupten vermögen. Bereits einige Zentimeter tief im Boden dagegen findet man durchaus andere Lebensbedingungen in einem Milieu, das viel gleichmässiger ist und wo die meisten schroffen Schwankungen nivelliert sind. Da wird das Leben und die Tätigkeit der Mikroorganismen nur selten durch die Witterungsveränderungen gestört, sodass alle Zersetzungsprocesse regelmässig ablaufen können.

Das Studium der Mikroklimata und der Schwankungen in Temperatur und Feuchtigkeit in verschiedenen Bodentiefen ist bereits genügend gefordert um das Obengesagte mit einer Fülle von Be-

legen zu stützen. Im Ramen dieser, bloss den allgemeinen Gedankengang angebenden, Mitteilung ist es aber unmöglich all diese Daten anzuführen. Hier muss man sich begnügen mit der Angabe der Tendenz.

Überblickt man nochmals die prinzipiellen Milieuunterschiede auf der Bodenoberfläche und in tieferen Schichten, dann wird man geradezu gezwungen den Wert dieser Unterschiede sehr hoch einzuschätzen. Es sind eben zwei gänzlich verschiedene Welten. Während *in* dem Boden die mikrobiellen Prozesse sich im Dunkeln und verhältnissmässig ungestört vollziehen, verlaufen sie auf der Oberfläche zuweilen im vollen Sonnenlichte und in Stössen mit zahlreichen Unterbrechungen, wobei die Kleinlebewesen durch ungünstige Bedingungen immer wieder inaktiviert werden. Diese Inaktivierung kann zweierlei sein: viele Mikroben werden bei jeder Verschlechterung der Lebensbedingungen eben absterben, nur resistente encystierte Stadia oder Sporen hinterlassend, andere sind dagegen befähigt zeitweilig durch Eintrocknen oder Gefrieren in den Zustand latenten Lebens überzugehen um, sobald die Bedingungen sich im günstigen Sinne ändern, wieder zum aktiven Leben zu erwachen. Die Mikrobenaktivität verläuft auf der Bodenoberfläche demzufolge zum grössten Teil in einem Zustande wobei die Organismen entweder im Absterben begriffen sind, beziehungsweise sich einkapseln, oder eben neue Generationen die Rolle der vorigen übernehmen und die abgestorbenen Zellen der vorigen Generation wiederum mineralisierend angreifen. Sowohl chemisch als mikrobiologisch ist die Mikrobentätigkeit hier also eine recht sonderbare, die oft eben an der Grenze der Lebensmöglichkeit für die betreffenden Organismen liegt. Chemisch hat das noch ungeklärte Folgen, die aber vielleicht eben bestimmt sind für die Bildung von Dauerhumus. Hierauf soll weiter unten zurückgekommen werden. Aber auch mikrobiologisch sind die Folgen der ungünstigen und schnell wechselnden Lebensbedingungen auf der Bodenoberfläche sehr weitgehend, da sich hierdurch auf der Oberfläche eine ganz specielle Mikrobenassociation bildet, die sich prinzipiell von der *im* Boden unterscheidet.

Leider ist diese Frage noch so gut als garnicht studiert; nur einige zufällige Beobachtungen aus den Jahren 1935–1940 auf Dauerweiden in der Provinz Nord-Holland können das Gesagte vielleicht bestätigen [14]). Damals wurden vom Verfasser Mikrobenzählungen durchgefürt auf verschiedenen Acker- und Dauerweide-Böden so-

wohl in schon Hunderte Jahre alten Poldern als auch im erst im Jahre 1930 bedeichten Wieringermeerpolder. Leider beschränkte die Arbeit sich auf die zellulosezersetzenden Organismen, so dass die gefundenen Zahlen sich nur auf diese eine physiologische Gruppe beziehen. Es wurde aber nicht nur die Gesammtzahl der Zellulosezersetzer bestimmt, sondern auch die Anzahl der Vertreter verschiedener systhematischer Gruppen: Actinomyceten, Proactinomyceten, Polyangiden, Cytophagen, Asporogene Bakterien, Sporenbildner und Schimmelpilze. Hierbei wurden überraschend deutliche in Tabelle II wiedergegebene Unterschiede zwischen der Bodenoberfläche (die oberste, höchstens einen cm dicke, abgeschälte Schicht) und dem darunter liegenden Boden (1–5 cm Tiefe) gefunden.

TABELLE II

Die Anzahl der Vertreter verschiedener systhematischer Gruppen von Zellulosezersetzern auf der Bodenoberfläche und in den darunterliegenden 5 cm, in Hunderttausenden pro Gramm Boden

	Schwerer Lehmboden alter Dauerweide bei Medemblik (Nord-Holland)		Sandiger Lehm, 7 Jahre alte Dauerweide, Wieringermeerpolder		Schwerer Lehm, Akkerland, Waard en Groetpolder (Nord-Holland), ca. 150 Jahre alt	
	0–1 cm	1–5 cm	0–1 cm	1–5 cm	0–1 cm	1–5 cm
Actinomyceten	360	150	98	16	37	56
Proactinomyceten	22	< 1	6	2	< 1	< 1
Polyangiden	26	1	13	< 1	< 1	< 1
Cytophagen	4	< 1	11	2	< 1	< 1
Asporogene Bakterien	12	8	6	9	5	14
Sporenbildner	5	< 1	8	3	3	4
Schimmelpilze	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Aus diesen Zahlen folgt deutlich, dass in den beiden untersuchten Dauerweiden die Bodenoberfläche viel reicher war an Actinomyceten, Polyangiden und Cytophagen und gewissermassen auch an Proactinomyceten und Sporenbildnern als der darunter liegende Boden, während die anderen Gruppen kaum zahlreicher waren. Im alten Ackerboden dagegen konnte man kaum merkbare Unterschiede im Verhältnis der Gruppen finden, nur war die Oberfläche hier als Folge des jährlichen Pflügens und daher des Fehlens einer Humusschicht, im Ganzen viel mikrobenarmer als auf den Dauerweiden. Die Mikrobenbevölkerung der Oberfläche ist also hauptsäch-

lich gekennzeichnet durch den relativen Reichtum an Actinomyceten und Myxobakterien. Diese beiden Gruppen haben sich auf eine ganz verschiedene Weise an die Lebensbedingungen der Bodenoberfläche angepasst: sehr viele Actinomyceten und Proactinomyceten haben ein besonderes Vermögen bei geringem Wassergehalt des Substrats noch zu gedeihen und um zeitweilig den Zustand absoluter Dürre zu vertragen. Sie erholen sich auch sehr schnell von diesem Scheintode sobald sie wieder benetzt sind. Die Myxobakterien dagegen sind charakterisiert durch die Bildung von zähem Schleim, worin ihre einzelnen Zellen zuweilen massenhaft eingebettet sind. In diesem Schleim können auch sie ungünstige Dürre-Perioden erfolgreich überstehen, wonach sie wieder augenblicklich zum aktiven Leben erwachen können.

Es ist auch bemerkenswerts, dass die Oberflächenschicht bei den Dauerweiden, wo sie zum grössten Teil aus organischem Material aufgebaut ist, weit mikrobenreicher ist als der darunter liegende Boden. Und doch wird eben in dieser Oberflächenschicht die organische Substanz bloss langsam und unvollkommen mineralisiert. Versuche diesen langsamen Abbau durch Messung der Kohlensäurebildung zu erfassen, scheiterten an dem Umstande, dass das Oberflächenmaterial, sobald es gemischt war und im Apparat in ständig günstigen Temperatur-, Feuchtigkeits- und Lüftungs-Bedingungen gehalten wurde, eine noch viel zahlreichere Mikroflora entwickelte und sehr lebhaft und schnell abgebaut wurde unter hoher Kohlensäure-Produktion. Dabei entwickelten sich darin sehr viele gewöhnliche Bakterien und Schimmelpilze, die die specielle Oberflächen-Mikroflora schnell überflügelten. Dieses Ergebniss ist eigentlich nichts mehr als eine Bestätigung des ganzen hier entwickelten Gedankenganges, dass es nämlich die spezialen an der Bodenoberfläche herrschenden Bedingungen sind, die den verlangsamten und unvollständigen Abbau verursachen, nicht aber irgendwelche Besonderheiten der Mikroflora oder der chemischen Zusammensetzung der Oberflächenschicht. Letztere Grössen sind eben nur Folgen der spezialen äusseren Bedingungen, nicht selbstständige Faktoren.

Obgleich also die Mikrobenzahlen in allen Böden in aufwärts gehender Richtung ansteigen, oft bis in die Oberflächenschicht, was in den Ackerböden der besseren Lüftung der oberen Schichten zugeschrieben werden muss, in den Wiesen- und Steppenböden da-

neben auch dem höheren Humusgehalt derselben, bedeutet es durchaus nicht, dass daher in diesen oberen Schichten und speciell auf der Oberfläche selber, auch die schnellste Humuszersetzung stattfindet. Im Gegenteil können die unzähligen auf der Oberfläche vorkommenden Mikroben unter den so schnell wechselenden Bedingungen doch keine effektive Mineralisation zu Stande bringen. Viele ihrer verharren ja den grössten Teil der Zeit im Zustande latenten Lebens. Was diese speciale Mikroflora aber wohl vermag, ist die Synthese des echten „Beständigen Humus". In der Bodenoberfläche ist daher die Werkstätte der Natur zu suchen, wo der Humus, und daher die Grundbedingung der Bodenfruchtbarkeit, geschaffen wird, und die verhältnissmässig langsam wachsenden, an die Unbilden des dort herrschenden Mikroklimas angepassten Kleinlebewesen sind die Organismen, die diese fundamentale Aufgabe erfüllen.

Ganz unabhängig von chemischen Studien der Humusbildung war Verfasser im Laufe der Jahre bereits zur obenstehenden Erkenntniss gekommen, sich dabei ausschliesslich auf mikrobiologische Studien und auf bodenkundliche Feldbeobachtungen stützend [15]). Eine weitere Stütze hat diese Theorie aber in den letzten Jahren erhalten in den Arbeiten von Enders. Dieser Forscher hat nämlich um 1938 neben den damals bereits entwickelten Theorien über die Humusbildung auch die s.g. Maillard'sche Melanoidinbildung aus Zuckern und Aminosäuren als einen möglichen Weg zur Humusbildung erkannt [4]) [5]). Damit näherte er sich der Auffassung Wachsman's über die Synthese des s.g. „Humusnucleus" aus Ligninen und Proteïnen als die essentielle Phase in der Humusbildung [44]), indem also auch er den Stickstoff nicht bloss als einen zufällig absorbierten, sondern als einen essentiellen Bestandteil des Humusmoleküls sah, im Gegensatz zu den Auffassungen von Odén, Marcusson und Fischer und Schrader. Die Theorie von Enders weicht aber insofern ab von derjenigen von Wachsman, dass er nicht ausschliesslich das Lignin als die Kohlenstoff lieferende Grundsubstanz betrachtet, sondern auch Zellulose und andere Kohlenhydrate dazu heranzieht. Prizipiell sind, meint er, alle Verbindungen mit freihen Carbonylgruppen im Stande in dieser Weise zu reagieren. Auch entsagt er den echten Proteïnen eine specielle Bedeutung, will sogar in den Aminosäuren und überhaupt in allen NH_2- und NH_4- haltigen Verbindungen, die wich-

tigsten Stickstoffliferanten sehen. Es gelang Enders damals auch tatsächlich schon durchaus Humusähnliche Verbindungen herzustellen aus Dextrose und Glycocoll durch längeres Kochen eines Gemisches beider Stoffe unter einem Rückflusskühler. Bei seinen weiteren Untersuchungen [6] [7] [8] [9] fand er, dass die Stickstofflieferenden Substanzen weitgehend variiert werden können ohne die Synthese zu beeinträchtigen, dass aber von allen Carbonylhaltigen Verbindungen Methylglyoxal und Glycerin-Aldehyd sich am schnellsten mit den Aminosäuren zu Melanoidinen verbinden. Und da Methylglyoxal bekanntlich in vielen Dissimilationen von Kohlenhydraten gebildet wird, ist Enders geneigt dieser Verbindung eine besondere Stellung bei der Humus-Bildung zu zu schreiben. Daher analysiert er auch mehrere Böden auf deren Gehalt an Methylglyoxal, ohne dabei aber überzeugende Resultate zu erzielen [7].

Weiterhin mit Methylglyoxal und Glycocoll arbeitend, machte er nun schon bald einige sehr interessante Beobachtungen. Erstens erwies es sich, dass die Bildung von Melanoidinen aus Methylglyoxal und Aminosäuren schneller verläuft je höher die Konzentration der beiden Grundverbindungen ist [8]. Es ist nicht so sehr die Bildung der ersten noch kaum dunkel gefärbten Produkte, sondern eben ihre Kondensation zu echten humusähnlichen, wasserunlöslichen dunkeln Melanoidinen, die einen hohen Gehalt verlangt. Enders konnte denn auch die irreversibel ablaufende Melanoidinbildung sehr fördern, wenn er das bloss schwach gebräunte Gemisch von Methylglyoxal und Glycocoll nach der ersten Reaktion lange Zeit im Sonnenlichte stehen liess, sodass die Lösung gänzlich eintrocknete. Die Kondensation und Dunkelfärbung konnte sogar noch weiter gefördert werden durch eine wiederholte Benetzung solcher eingetrockneter Lösungen und ihre erneute Eintrocknung, besonders wenn der Prozess im vollen Sonnenlichte verlaufen konnte. Schon in diesem frühen Stadium der Untersuchung hatte Enders hierdurch also eine Anweisung erhalten, dass in der Natur eine Humusbildung nach diesem Modell am wahrscheinlichsten ist da, wo der Wassergehalt des Bodens starken Schwankungen unterworfen ist, sodass die, während der aktiven Tätigkeit der Mikroben in einer Periode hoher Feuchtigkeit entstandenen Abbauproducte (Methylglyoxal und Stickstoffverbindungen) in der folgenden Dürre-Periode die resistenten Melanoidin-Humusstoffe bilden können. Kontinen-

tale, gemässigt aride Klima-Gebiete sollten also die günstigsten Bedingungen bieten [8]).

Die zweite merkwürdige Beobachtung betraf die starke Förderung der Melanoidinbildung durch eine alkalische Reaction und durch eine gesteigerte Oxydation des Gemisches. Diese Tatsache schliesst sehr gut an an die schon von Fischer und Schrader [11]) [36]) betonte Autoxydation des Lignins unter gleichzeitiger Aufnahme von Ammoniak-Stickstoff, die in den letzten Jahren hauptsächlich von Mattson c.s. [28]) [29]) als die primäre Vorbedingung zur Humusbildung erkannt ist. Es ist daher möglich, dass die letzten Phasen der Kondensation von Melanoidin-Produkten zu echten Humusstoffen vergleichbar sind mit der Bildung von Humus aus Lignin und Stickstoff, wie es von Mattson beschrieben ist.

Als Enders dann [9]) auch die Rolle der Mikroben bei der Humusbildung über Melanoidine in seine Untersuchungen bezog, ergab es sich weiterhin, dass das Vermögen diese Synthese unter im Boden herrschenden Bedingungen der Feuchtigkeit, der Koncentration der reagierender Stoffe, der Feuchtigkeit, u.s.w. zu stimulieren nicht irgend welchen specialen Organismen eigen war, sondern allen Mikroben, hauptsächlich aber den Mischkulturen oder gar den gesammten Populationen der Böden. Die Intensität der Synthese hing viel mehr ab von den herrschenden Lebensbedingungen als von der Art der Organismen. Eine noch bedeutungsvollere Beobachtung war es aber, dass die bildung der dunklen humusähnlichen Stoffe in seinen Versuchen nicht durch für die Mikroben günstige Bedingungen, sondern gerade durch sehr ungünstige, beschleunigt wurde. Am schnellsten verlief diese Synthese, wenn die Mikroben in einen Zustand der langsamen Autholyse oder des Absterbens gebracht wurden. Sowohl hohe Temperaturen von 40–50° C als auch Mangel an Wasser und daher zu hohe Koncentrationen der gelösten Stoffe, oder Vergiftung durch chemische Mittel, waren alle günstige Factoren für die Melanoidin-Kondensation zu Humus und auch für die Bildung von Methylglyoxal. Und wiederum kann man aus diesen Laboratoriumresultaten die Schlussfolgerung ableiten, dass in der Natur solche Bedingungen am ehesten erwartet werden können im gemässigt ariden Klima. Enders sagt denn auch, dass .... „Die vom Klima abhängigen, täglich und jährlich bedingten Temperaturschwankungen sind sicherlich in dem Masse an der Humusbildung

beteiligt, in dem sie zur Thermolyse Anlass geben" .... „das noch abgesehen von dem günstigen Einfluss auf die Kondensationsvorgänge" ....

Die im Obenstehenden verhältnissmässig detailliert besprochene Melanoidin-Theorie von Enders ist augenblicklich allerdings nur noch eine Theorie, die vielleicht kaum besser begründet ist als die vielen anderen Theorien zur Erklärung der Humusbildung. Sie ist denn auch bereits von mehreren Seiten kritisiert worden. Eines der schwersten Bedenken gegen das Humusbildungsschema aus Methylglyoxal und Aminosäuren über Melanoidine als Zwischenstufe ist vielleicht wohl die Tatsache, dass alle so gebildeten Produkte zu stickstoffreich sind verglichen mit sogar dem besten natürlichen Schwarzerde-Humus und dass sie in mehreren Eigenschaften von den aus natürlichem Humus isolierten und gereinigten Humus-Produkten abweichen. So fehlt ihnen jegliche Gerbwirkung (keine Niederschlagbildung mit Gelatine bei hohen Kochsalzkonzentrationen), ihre Chlorierungsprodukte sind aetherunlöslich und sie spalten keine Maleinsäure ab bei Behandlung mit Chlordioxyd. Dies sind alles Eigenschaften, worin sie sich von natürlichen Humussubstanzen unterscheiden. Viele andere Punkte haben sie aber mit den natürlichen Humus-Substanzen gemein: sie sind Alkalilöslich, Säure-fällbar, Acetylbromid-unlöslich, können nach Simon [39] [40] (und spätere Veröffentlichungen) auch durch Alkali-Salze von Säuren mit unlöslichen Erdalkali-Salzen in Lösung gebracht werden, weisen ein sehr ähnliches C/N Verhältnis auf und haben nach Schuffelen und Bolt [37] dieselbe Basenaustauschkapazität als natürlicher Humus. Es ist daher sehr schwer ein Urteil zu fällen über die Identität der Melanoidin-Kondensate und der natürlichen oder auf andere Weise künstlich bereiteten Humin-Säuren, zumal die Abgrenzung der echten Humus-Stoffe von anderen dunkel gefärbten Kolloiden bisher noch durchaus nicht geklärt ist und jeder Forscher sich noch seiner eigenen Methoden bedient und eigenen Theorien huldigt. Es ist daher augenblicklich noch zu früh sich pro oder kontra das Schema von Enders auszusprechen; sehr wahrscheinlich aber verläuft die Humusbildung in der Natur längs vielen Wegen, sodass mehr als eine der vorgeschlagenen Theorien richtig sein könnten. So hat ja bereits Enders selber die Möglichkeit dahingestellt, dass autoxydiertes Lignin vielleicht eine chemische Struktur hat, die verwandt ist mit der von Melanoidin-Kondensaten,

nur NH_2-ärmer ist. Die Bildung von Lignin könnte dann eben auch von Triosen ausgehen, so wie die von Humin-Säuren und von Melanoidin-Kondensaten. Man würde hierbei also zu tun haben mit einem Komplex von vielen miteinander verwandten Synthesen von Lignin- und Humusartigen Substanzen, die zich alle prinzipiell unterscheiden von der Synthese aliphatischer Kohlenhydrate, dadurch eine zweite Hauptgruppe von Synthesen in der Natur darstellend, die vielleicht nicht weniger wichtig ist für das gesammte Leben.

Diesen und dergleichen Verallgemeinerungen und Deduktionen kann vorläufig allerdings jeglicher Wert in Abrede gebracht werden. Jedenfalls sind sie noch recht speculatief. Ja, sogar die ganze Melanoidin-Theorie von E n d e r s kann als ungenügend begründet abgelehnt werden. Der wertvollste Beitrag von E n d e r s zur Humusforschung ist aber überhaupt nicht seine Humusbildungstheorie, sondern die klare Erkenntniss der Bedeutung von Perioden suboptimaler bis letaler Lebensbedingungen für die Kleinlebewesen bei der Bildung des echten Dauerhumus. Hiermit hat E n d e r s ein gänzlich neues, noch volkommenl unbearbeitetes Gebiet der biochemischen Forschung geöffnet — das Gebiet des Stoffwęchsels absterbender oder in Autholyse begriffener Zellen. Leider hat er bis jetzt nicht über empyrische Versuche berichtet, wobei in mehr oder weniger natürlichen Bedingungen der Einfluss solcher scharfer Schwankungen der Lebensfaktoren auf die Humusbildung untersucht wird. Seine Versuche beschränkten sich auf durchaus künstliche Präparate oder auf Reinkulturen von Mikroben. Experimente über Humusbildung in natürlichem Boden müssen also noch angestellt werden. Leider fehlte es Verfasser im Laufe der letzten Jahre an Zeit und Gelegenheit um diese Arbeit zu unternehmen. Bloss ein orientierender Versuch konnte in beschränktem Masse durchgefürt werden.

Dieser Versuch musste am zweckmässigsten nicht als Feldversuch sondern als Laboratoriumsexperiment angestellt werden, da man dabei die Lebensbedingungen nach Belieben variieren konnte. Es galt hierbei Bedingungen zu schaffen, die eine eventuelle Humusspeicherung möglichst deutlich zeigen würden. Daher wurde nicht ein wirklich natürlicher Boden verwendet, sondern eine Mischung von gereinigtem Quarzsand, reiner (für Filtrationszwecke im Laboratorium verwendeter) Kieselgur und einem homogenen humusarmen Lehmboden (aus dem Untergrunde eines Ackers auf dem allu-

vialen Lehm des Ottawa-Flusstales (Canada) im Gewichtsverhältniss der Trockensubstanzen von 3 : 1 : 1. Diese Mischung stellt einen sehr humusarmen und leichten Boden vor, jedoch mit einem genügenden Gehalt an Mineral-Bestandteilen eines natürlichen Bodens. Ihr Gehalt an organischem Kohlenstoff war bloss 0,17% (C_0). Der Mischung wurden zugesetzt 4% kohlensauren Kalk als reines feines Pulver (Kreide) und sie wurde angefeuchtet bis zu 60% der vollen Wasserkapazität (ca. 18% Wassergehalt des gesammten Gemisches) mit einer Lösung enthaltend 0.05% K_2HPO_4, 0.025% $MgSO_4.7H_2O$ und 0.025% NH_4NO_3. Mit dieser Mischung wurden vier viereckige glasierte Steinbehälter von ca. 440 cm^2 Oberfläche und 16 cm Tiefe beschickt. Der Boden der Gefässe war perforiert, sodass bei reichlichem Begiessen ein Teil des Wassers ablaufen konnte. Zur organischen Düngung dieser Gefässe wurde eine Mischung von Weizenmehl, Weizenstrohmehl und Luzernemehl verwendet im Verhältniss von 15 : 70 : 15. Zwei der Behälter erhielten zu Beginn des Versuches im September 1947 ca. 2.5% ihres Gewichtes von dieser Mischung, berechnet als Trockensubstanz (A), die beiden anderen nur 0.5% (B). Im März des nächsten Jahres und nochmals im September 1948 wurden diese organischen Düngungen wiederholt, sodass die Behälter A im Ganzen ca. 7.5% an organischer Trockensubstanz im Laufe von zwei Jahren erhielten — also eine sehr reichliche organische Düngung, während den Behältern B nur 1.5%, also eine mässigere, aber immerhin noch recht starke, Düngung verabreicht wurde. Von jedem Gefässpaar wurde nun das eine (1) in einem Thermostat bei 25° C im Dunklen gehalten. Drei mal wöchentlich wurde hier durch Begiessen das verdunstete Wasser angefüllt. Diese beiden Gefässe verblieben also in nahezu optimalen Bedingungen für das Leben und die Tätigkeit der Mikroben, da die Temperatur konstant war und die Feuchtigkeit auch bloss zwischen 17.2 und 18.6% schwankte. Um einer Anhäufung von Zersetzungsprodukten vorzubeugen, wurden diese Gefässe jede zwei Monate sehr stark begossen, sodass der Boden gewissermassen perkoliert wurde, wonach man ihn solange nicht begoss (ca. 14 Tage), bis der ursprüngliche Wassergehalt von ca. 18% wieder erreicht war. Die beiden anderen Gefässe (2) befanden sich im Sommerhalbjahre in einem Gewächshause mit diffusem Licht bei einer Temperatur von ca. 32° C. Sie wurden einmal monatlich stark begossen bis ein Teil des Wassers durch den Boden ablief, danach aber

den ganzen Monat unbegossen gelassen, sodass sie nach 2 bis 3 Wochen gänzlich eintrockneten. Diese Gefässe durchliefen also jedmonatlich das ganze Trajekt von der Sättigung mit Wasser bis zum lufttrocknen Zustande. Im Winterhalbjahr wurden sie in einem ungeheizten Gewächshause im vollen Sonnenlicht gehalten, wo die täglichen Temperaturschwankungen bei sonnigem Wetter sehr gross waren: von ca. — 20° C in der Nacht bis zu + 35° C am Tage. Wenn auch nicht die gesammte Mächtigkeit, dann doch jedenfalls die oberen Schichten, befroren und tauten täglich immer wieder auf. Das Begiessen wurde im Winter abgestimmt nach dem Bedürfniss, aber auch wieder absichtlich sehr unregelmässig vorgenommen um Perioden hohen Wassergehaltes auf solche absoluter Dürre einander folgen zu lassen. In allen vier Behältern wurde der Boden jede zwei Monate herausgenommen, sorgfältig gemischt und wieder in die Gefässe eingetragen. Allerdings wurde hierdurch jegliche Ausbildung einer Oberflächenschicht unterbunden. Bei diesem vorläufigen Versuch, wobei die organische Düngung ja auch nicht auf die Bodenoberfläche aufgetragen, sondern durch den gesammten Boden verteilt war, würde im ungemischten Boden eine unerwünschte Differenzierung der Schichten stattfinden, wodurch der Versuch komplizierter geworden wäre.

Im März 1950, also nach einer Frist von zwei und einhalb Jahren, wurde der Versuch beendet und wurde in den Gefässen der gesammte organische Kohlenstoff (C_t) und der in Acetylbromid unlösliche Teil, also der wirkliche Humus (C_h) bestimmt. Beide Bestimmungen geschahen mit Hilfe der Chromsäure-oxidations-Methode, wie sie von Springer anbefohlen wird [41]). Aus diesen Ergebnissen und dem im Bodengemisch vor der Düngung mit organischen Stoffen gefundenem Gesammt-Kohlenstoff (C_0) konnten dann die zugehörigen „Zersetzungsgrad-Werte" (Z.G.) im Sinne von Springer [41]) [42]) [43]) und Simon [39]) [40]) errechnet werden. Da aber in einigen der Gefässe der neu-aufgebaute Humus noch recht unbedeutend war, und man annehmen konnte, dass der alte Humus im zur Mischung verwendeten Lehmboden weit ausgereift und daher im Laufe des Experimentes kaum abgebaut war, wurde der Z.G. nicht nur für den gesammten Boden berechnet, also als Z.G. $= C_h/C_t \times 100$, sondern auch für den neu aufgebauten Humusanteil, also als Z.G. $= C_h - C_{ho}/C_t - C_o \times 100$, wobei C_{ho} den in Acetylbromid unlöslichen Teil des zu 0.17% im Bodengemisch vór der organischen

Düngung sich befindenden alten Humus vorstellt. Dieser C_{ho}-Wert betrug nämlich ca. 0.155%, dessen Zersetzungsgrad war also 91%, was allerdings sehr hoch ist, bei einem sehr alten und stabielen Humus aber erwartet werden kann. Alle hier angeführten Z.G.-Werte sind hoch, da nach der Acetylbromid-Behandlung der Rückstand nur mit Ether gewaschen wurde.

Die so gefundenen und errechneten Grössen für die vier Gefässe sind in Tabelle III wiedergegeben.

TABELLE III

	C_t *)	$C - C_o$ *)	C_h *)	Z.G. $= \frac{C_h}{C_t} \times 100$	Z.G. $= \frac{C_h - C_{ho}}{C_t - C_o} \times 100$
Gefäss A 1	0.36	0.19	0.27	75	61
,, A 2	1.07	0.90	0.84	78	76
,, B 1	0.23	0.06	0.19	83	58
,, B 2	0.40	0.23	0.34	85	80.5

Diese Zahlen benötigen kaum einer näheren Erläuterung. Sowohl an den C_t-Werten als noch deutlicher an den $C_t - C_o$-Werten sieht man schon, dass die unregelmässig behandelten Gefässe (2) viel mehr Gesammtkohlenstoff gespeichert haben als die ständig in optimalen Lebensbedingungen gehaltenen Gefässe (1). Und dass es sich hierbei nicht nur um eine Verzögerung des Abbaues handelt, folgt überzeugend aus den Werten für C_h und aus den Zersetzungsgraden. Hauptsächlich die nach der Formel $C_h - C_{ho}/C_t - C_o \times 100$ für den neu gebildeten Humus berechneten Zersetzungsgrade sind, soweit man sie als zuverlässig ansehen kann, sehr demonstratief. Die Behandlung der Gefässe (2) hat also nicht nur die Mineralisation der organischen Stoffe verzögert, sondern auch schon beträchtlich mehr echten Dauerhumus aufgebaut, so selbst, dass die viel grösseren neu-gebildeten Humus-Mengen bereits höhere Z.G.-Werte aufweisen als die viel kleineren Mengen in den übereinstimmenden Gefässen (1).

Es wäre erwünscht gewesen nun alle 4 Gefässe in die regelmässig optimalen Bedingungen der Gefässe (1) zu bringen und so längere Zeit zu halten ohne erneute organische Düngung um den Rückgang des Humusgehaltes verfolgen zu können, da man erwarten kann-dass der in den Gefässen (2) gebildete beständige Humus sehr wieder, standsfähig sein wird, sodass der Unterschied zwischen den Gefäs-

*) In Gewichts-% der Gesamten Bodentrockensubstanz.

sen (1) und (2) lange Zeit erhalten werden könnte. Leider musste der Versuch aber infolge der Abreise des Verfassers im Frühjahr 1950 abgebrochen werden.

Dieses Experiment ist also entschieden bloss ein vorläufiges, orientierendes gewesen, dem viele Fehler anhaften; die Ergebnisse in diesem unnatürlichen akzentuierten Falle sind aber bereits nach zwei Jahren so überzeugend, dass man darin eine sehr starke Stütze für die Ansicht von E n d e r s erblicken kann, wonach eine aktieve Humusbildung überhaupt nur möglich ist, wenn die Mikroben unter sehr ungünstigen Bedingungen leben. Weiteren Untersuchungen muss es vorbehalten bleiben dieses sehr interessante und ungemein wichtige Problem genügend experimentell zu klären. Inzwischen ist der Grundgedanke von E n d e r s bereits von zwei Seiten bestätigt worden, sei es auch nicht auf Grund experimenteller Belege, sondern nur deduktiv: Erstens hat L a a t s c h schon im Jahre 1940 [23]) betont, dass der wertvolle Schwarzerdehumus sich nur in einem Klima bilden kann, worin das Boden-Profiel oft bis zu einer beträchtlichen Tiefe gänzlich austrocknet. In seinen späteren Arbeiten [24]) sucht L a a t s c h allerdings andere Wege zur Erklärung der Humusbildung und erblickt in den bodenbewohnenden Tieren die Stätte der Humussynthese. Die zweite Äusserung der Übereinstimmung mit E n d e r s hat M a i w a l d im Jahre 1943 gegeben [26]) als er als Hauptbedingung für eine gute Wirkung des Stalldüngers im Boden verlangt, dass der Mist bald nach dem Unterpflügen im Boden stark eintrocknet, bevor er dann später bei nasserem Wetter der Weitervorrottung anheimfällt. Das Düngen des Ackers mit Stallmist soll daher immer während der trockenen Jahreszeit stattfinden.

Rückblickend auf die gesammte Litteratur über Humus-Bildung und Humus-Zehrung, speziell aber auf die Arbeiten von E n d e r s, kann also festgestellt werden, dass jetzt schon sehr Vieles angeführt werden kann zur Bestätigung der Theorie der Humus-Synthese in absterbenden und der Autholyse anheimfallenden Mikroben-Associationen. Es ist durchaus nicht notwendig auch mit dem von E n d e r s vorgeschlagenen Chemismus der Humusbildung einzustimmen um de Rolle der ungünstigen Lebensbedingungen und speziell der hohen Temperaturen und der Dürre für die Humusbildung hoch einzuschätzen. Auch auf diesem Gebiete muss noch sehr Vieles untersucht werden. Augenblicklich ist es noch nicht möglich

zu unterscheiden ob es die dissimilatorische Bildung gewisser-Verbindungen (Methylglyoxal) ist oder die Förderung der irreversibelen Kondensation der ursprünglichen Reaktionsprodukte zu den unlöslichen Humusstoffen oder gar eine Auslese einer speciellen Microflora, wodurch starken Schwankungen unterworfene und durchschnittlich ungünstige Lebensbedingungen die Humusbildung fördern. Das einzige, was aber genügend belegt zu sein scheint, ist die blosse Tatsache dieser Förderung. Hiermit muss man sich augenblicklich also begnügen. Doch ist diese Erkenntnis schon sehr wertvoll, sodass sehr weitgehende Schlussfolgerungen daraus gezogen werden können. So hat E n d e r s ja schon — wie bereits angeführt — auf Grund seiner Experimente ein gemässigt arides Klima als das günstigste für die Humusbildung angesprochen. Sonderbarerweise ist aber noch nie die wichtigste Konsequenz aus diesem Befunde gezogen worden, nämlich dass die für Humusbildung erforderlichen wechselnden und oft ungünstigen Bedingungen eben nirgends so weitgehend ausgebildet angetroffen werden als auf der Bodenoberfläche. Da hat man doch die frequenten und schroffen Schwankungen der Feuchtigkeit und der Temperatur, da steigt letztere zuweilen bis zu einem letalen Niveau, da hat oft die Sonnenbestrahlung einen grossen Einfluss und da auch schliesslich herrscht der Zustand sehr starker Aeration. Genau dasjenige, was für die Humusbildung notwendig ist, findet man auf der Bodenoberfläche. In keinem Klima können die erforderlichen Bedingungen sich in tieferen Schichten des Bodens so günstig für die Humusbildung gestalten als auf der Oberfläsche; und in feuchtem humiden Klima werden Perioden der Dürre und der hohen Temperaturen überhaupt nur auf der Oberfläche des Bodens erreicht.

Wenn man neben diesen Erwägungen auch die statistischen Daten über die Vernichtung des Humusvorrats nach der Urbarmachung des Bodens in Betracht zieht, dann wird man wohl durchaus getroffen von der weitgehenden Übereinstimmung aller Ergebnisse, die alle die hervorragende Bedeutung der Bodenoberfläche für die Humusbildung unterstreichen. Verfasser will eine beschränkte Humusbildung in anderen Teilen des Bodens, so z.B. im Kot der Bodeninsekten und Würmer oder, in sehr günstigem ariden Klima, sogar in der ganzen Mächtigkeit des Bodens, durchaus nicht in Abrede bringen, solche Humussynthesen aber sind unbedeutend im Vergleich mit derjenigen auf der Bodenoberfläche und ohne letztere

würde überhaupt keine Humusspeicherung in grossem Masstabe möglich gewesen sein, ja, würde die Welt vielleicht kaum bewohnbar, oder doch jedenfalls viel unfruchtbarer und öder sein.

Die Erhaltung einer ungestörten Bodenoberfläche unter einer konsolidierten Pflanzengenossenschaft in grossen Gebieten der landwirtschaftlich nutzbaren Landoberfläche ist demnach eine Notwendigkeit wenn man keinen Raubbau betreiben will. Gegen diese Regel wurde aber seit dem Ansässigwerden der Menschheit und seit dem ersten Brechen der Scholle stets gesündigt, und auch heute noch ist die Bedeutung einer ungestörten Bodenoberfläche als Vorbedingung für den Aufbau der Bodenfruchtbarkeit und Existenzmöglichkeit für die Ackerbau treibenden Menschengemeinschaften nicht genügend erkannt. Rücksichtslos und sich kaum um die Zukunft kümmerend wird noch stets mehr und mehr der jungfräulichen Wiesen, Steppen, Savannen, Moore und Wälder in Äcker verändert, dabei oft nicht einmal sparsam mit dem Humuskapital im Boden umgehend, und alle Warnungen von sich weisend. Eine Katastrophe ist hierdurch auf die Dauer unvermeidlich, da die Menschheit mit stets zunehmender Geschwindigkeit einer weitgehenden Erschöpfung der Humusvorräte und damit auch der Bodenfruchtbarkeit zustrebt. In früheren Perioden der Geschichte hat derselbe tragische Werdegang sich schon mehrmals in gewissen Gebieten vollzogen. Damals waren aber immer nur gewisse begrenzte Gebiete dicht bevölkert und wurde nur da der Boden so intensiv bearbeitet, dass Humuszehrung stattfand. Als dann in solch einem Gebiet die unvermeidliche Verarmung eintrat, ging eben die da emporgekommene Kultur zu Grunde, in anderen, noch ungenutzten, Gebieten blühte aber eine neue Kultur auf, eine neue Epoche der Geschichte einleitend. Das erschöpfte Land, das nun seine dichte Bevölkerung verloren hatte, konnte sich nun zuweilen sogar wieder erholen. Die Zunahme der Weltbevölkerung und die Ausbreitung der europäischen Arbeitsmethoden über beinahe die ganze bewohnbare Oberfläche der Erde machen eine Verschiebung der Kulturzentra heutzutage aber unmöglich. Der gesammte Humusvorrat der Erde ist jetzt zugleich in Anspruch genommen, überall zugleich wird die Humusproduzierende Werkstätte der Natur — die Bodenoberfläche — vernichtet und es gibt keine Möglichkeiten mehr zum ausweichen vor der unbarmherzig aufkommenden Not von morgen.

Received July 22, 1950.

LITTERATURVERZEICHNIS

1) Brown, A. L., Wyatt, F. A. and Newton, J. D., Effects of cultivation and cropping on the chemical composition of some western Canada prairie soils. Part II. Sci. Agr. **23**, 229 (1942).
2) Caldwell, A. C., Wyatt, F. A. and Newton, J. D., Effects of cultivation and cropping on the chemical composition of some western Canada prairie soils. Sci. Agr. **19**, 258 (1939).
3) Ching-Kwei-Lee and Bray, R. H., Organic matter and nitrogen contents of soils as influenced by management. Soil Sci. **68**, 203 (1949).
4) Enders, C. und Theis, K., Die Melanoidine und ihre Beziehung zu den Huminsäuren. Brennstoff-Chem. **19**, 360, 402, 439 (1938).
5) Enders, C., Zur Kenntniss der Melanoidine. Kolloid-Z. **85**, 74 (1938).
6) Enders, C., Über den Chemismus der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen I. Biochem. Z. **312**, 339 (1942).
7) Enders, C. urd Sigurdsson, S., Idem II. Über das Vorkommen von Methylglyoxal in Erde. Biochem. Z. **313**, 174 (1943).
8) Enders, C., Idem III. Die Abhängigkeit von Bildungsgeschwindigkeit, Eigenschaften und Zusammensetzung der aus Methylglyoxal und Glycocoll gebildeten Huminsäuren von verschiedenen Faktoren. Biochem. Z. **313**, 352 (1943).
9) Enders, C., Idem IV. Die Rolle der Microorganismen bei den Humificierungsvorgängen. Biochem. Z. **315**, 259 (1943).
10) Faulkner, H., Plowman's folly, Grosset and Dunlap, New York (1943).
11) Fischer, F. und Schrader, G., Entstehung und chemische Struktur der Kohle (1922).
12) Gustafson, A. F., Nitrogen and organic matter in the soil. Bull. 211 of the Cornell Extension Bull., New York State Coll. of Agric., Cornell Univ., Ithaca, N.Y. (1945).
13) Gustafson, A. F., Using and managing soils. McGrow-Hill Book Comp., Inc., New York and London (1948).
14) Harmsen, G. W., Onderzoekingen over de aerobe celluloseontleding in de grond. Dissert. Wageningen (1946).
15) Harmsen, G. W., Ophoping van humus in onze gronden in verband met de exploitatiewijze van jonge polders. Unveröffentlichter Vortrage gehalten während der Tagung des Vorstandes der Meliorationsabteilung der Zuidersee-Werke (Wieringermeerdirectie), October 1946.
16) Hissink, D. J., De bodemkundige gesteldheid van de achtereenvolgens ingedijkte dollardpolders. Verslag v. Landb. Onderzoek **41** B (1935).
17) Howard, A., The waste products of Agriculture, their utilisation as humus. J. Roy Soc. Arts (1933).
18) Jenny, H., Soil fertility losses under Missouri conditions. Missouri Agr. Exp. Stat. Bull. 324 (1933).
19) Jenny, H., Factors of soil formation. McGrow-Hill Book Comp. Inc., New-York and London (1941).
20) Jenny, H., Gesetzmässige Beziehungen zwischen Bodenhumus und Klima. Die Naturwissenschaften **18**, 859 (1930).
21) Jenny, H., Gessel, S. P. and Bingham, F. T., Comparative study of decomposition-rates of organic matter in temperate and tropical regions. Soil Sci. **68**, 419 (1949).
22) Kardos, L. T., Lysimeter studies with cultivated and virgin soils under subhumid rainfall conditions. Soil Sci. **65**, 367 (1948).

23) Laatsch, W., Der Wasserhaushalt der mitteldeutschen Schwarzerde. Bodenkunde u. Pflanzenernähr. **21 22**, 95 (1940).
24) Laatsch, W., Untersuchungen über die Bildung und Anreicherung von Humusstoffen. Berichte über Landtechnik, Heft 4, Bodenbearbeitung als Kernproblem der Bodenfruchtbarkeit (1948).
25) Lemmermann, O., Ältere und neuere Untersuchungen über einige Wirkungen von Stalldünger und von Mineraldüngern auf die Ernten und den Boden. Z. Pflanzenernähr., Düngung und Bodenk. B **11**, 1 (1932).
26) Maiwald, K., Die Weiterverrottung des Stalldüngers im Boden. Bodenkunde u. Pflanzenernähr., **29**, 140 (1943).
27) Maschhaupt, J. G., Bodemkundige Onderzoekingen in het Dollardgebied. Verslag. Landb. Onderzoek. No 54. 4 (1948).
28) Mattson, S. and Koutler-Andersson, E., The acid-base condition in vegetation, litter and humus. V. Products of partial oxydation and ammonia-fixation. Lantbruks-Högskol. Ann. (The annals of the Agric. Coll. of Sweden) **10**, 284 (1942).
29) Mattson, S. and Koutler-Andersson, E., Idem. VI. Ammonia fixation and humus nitrogen. Ibidem **11**, 107 (1943).
30) Meyer, C., Vijftienjarige proef met stalmest op perceel 5 van de proefboerderij te Borgercompagnie (Oude dalgrond met 11% humus). Verslag. Landb. Onderzoek. Rijkslandbouwproefstation te Groningen (1940).
31) Meyer, C., Het humusgehalte van de grond. Landbouwkund. Tijdschr. **53**, 345 (1941).
32) Miller, M. F. and Krusekopf, H. H., The influence of systems of cropping and methods of culture on surface runoff and soil erosion. Missouri Agr. Exp. Sta. Research Bull. **177** (1932).
33) Mohr, E. C. J., De grond van Java en Sumatra. Amsterdam (1930).
34) Newton, J. D., Wyatt, F. A. and Brown, A. L., Effects of cultivation and cropping on the chemical composition of some western Canada prairie soils. Part III Sci. Agr. **25**, 718 (1945).
35) Salter, R. M. and Green, T. C., Factors affecting the accumulation and loss of nitrogen and organic carbon in cropped soils. J. Am. Soc. Agron. **25**, 622 (1933).
36) Schrader, G., Über die Autoxydation des Lygnins, der natürlichen Humusstoffe und der Kohlen und ihre Beeinflussung durch Alkali. Brennstoff-Chem. **3**, 161, 181 (1922).
37) Schuffelen, A. C. and Bolt, G. H., Some notes on the synthesis of humus compounds. Landbouwkund. Tijdschr. **62**, 333 (1950).
38) Siegel, O., Humusarneicherung durch Stallmistzufuhr? Forschungsdienst. Sonderheft **17**, 119 (1941).
39) Simon, K., Über die Herstellung von Humusextracten mit neutralen Mitteln. Z. Pflanzenernähr., Düngung Bodenk. A **14**, 252 (1929).
40) Simon, K., Über die Vermeidung alkalischer Wirkung bei der Darstellung und Reinigung von Huminsäuren. Z. Pflanzenernähr., Düngung Bodenk. A **18**, 323 (1930).
41) Springer, U., Neuere Methoden zur Untersuchung der organischen Substanz im Boden und ihre Anwendung auf Bodentypen und Humusformen I. Die Methoden. Z. Pflanzenernähr., Düngung Bodenk. A **22**, 135 (1931).
42) Springer, U., Idem. II. Die Anwendung der Methoden auf Bodentypen und Humusformen. Z. Pflanzenernähr., Düngung Bodenk. A **23**, 1 (1932).
43) Springer, U., Der heutige Stand der Humusuntersuchungsmethodik mit besonderer Berücksichtigung der Trennung, Bestimmung und Charakterisierung der

Huminsäuretypen und ihre Anwendung auf charakteritische Humusformen. Bodenkunde u. Pflanzenernähr. **6**, 312 (1938).

44) Waksman, S. A. and Iyer, K. R. N., Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus. I. On the synthesis of the „Humusnucleus". Soil Sci. **34**, 43 (1932).

Plant and Soil, III no 2 April 1951

THE AVAILABILITY OF VARIOUS MANGANESE OXIDES TO PLANTS

by L. H. P. JONES and G. W. LEEPER

School of Agriculture, University of Melbourne, Australia

INTRODUCTION

It has been shown that the natural supply of manganese to plants in neutral and alkaline soils is correlated with the amount extracted by a solution of quinol in ammonium acetate, and further, that a synthetic manganese dioxide cured grey-speck of oats (manganese deficiency disease) [9] [10]. This work leads to further inquiries into the nature of the higher oxides which can supply plants with manganese.

Recent workers have found how to prepare manganese oxides of the same structure as the known minerals, as identified with X-rays. It is therefore possible, today, to give a more exact description than just "manganese dioxide". The present work is the first stage of our inquiry: to prepare various oxides, identify them by X-ray diffraction, measure their chemical activity, and observe their effect on the growth of plants after mixing with different soils.

The manganese oxides form a complex subject. During the last decade light has been thrown on them from two sources. Feitknecht and Marti [7] [8] have studied synthetic oxides and hydrous oxides covering the whole range of valence of manganese from two to four. Other workers, notably Cole, Walkley and Wadsley [2], have studied manganese dioxides for use in Leclanché cells.

While there is an ideal formula corresponding to each crystalline structure, the actual composition of any one may vary over a wide range, as is common for ionic oxides [12].

PREPARATION AND IDENTIFICATION OF OXIDES

The synthetic oxides which we have used are shown in Table I with brief descriptions of the methods of preparation. Where similar

methods to those of other workers have been used, references to their papers are included. The oxides are referred to by the name of the corresponding mineral type, and are further distinguish-

TABLE I

Sample No.	Method of Preparation	n in formula MnO_n	X-ray structure
1.	H_2O_2 oxidation of $MnSO_4$ in solution with $^1/_2$ equivalent of NaOH in ice bath [7]).	1.50	Manganite *)
2.	H_2O_2 oxidation of $MnSO_4$ in solution with $^2/_3$ equivalent of NH_3. When H_2O_2 decomposed further $^1/_3$ equivalent NH_3 added and mixture boiled [7]).	1.35	Hausmannite
3.	Sample 2 heated in air at 900°C for 6 hours.	1.35	Hausmannite
4.	Precipitation from solution of $KMnO_4$ by slow addition of H_2O_2 [6]).	1.99	Manganous manganite†)
5.	Precipitation from solution of $Ca(MnO_4)_2$ by slow addition of $MnSO_4$ solution.	1.99	Manganous manganite
6.	Sample 5 heated in air at 500°C for 6 hours.	1.87	Cryptomelane
7.	Sample 5 heated in air at 900°C for 6 hours.	1.52	Hausmannite plus unknown structure
8.	Hydrolysis of $MnCl_4$ [2]).	1.97	Pyrolusite
9.	$Mn(NO_3)_2$ heated in air at 150° to 200°C. The oxide heated further in oxygen at 500°C to remove water.	2.00	Pyrolusite
10.	Pyrolusite (prepared by thermal decomposition of $Mn(NO_3)_2$), heated at 650° to 700°C in air for 45 hours.	1.50	Bixbyite
11.	Hammersley River ore §)	n.d.	Pyrolusite
12.	Auckland Ore **).	n.d.	γ-MnO_2 and cryptomelane
13.	Precipitation from neutral solution of $NaMnO_4$ by $MnSO_4$ solution.	n.d.	n.d.

*) Lines are diffuse, but give evidence of manganite.

†) This unsatisfactory name has been given to a certain structure, and is therefore followed here, even though the composition may come close to MnO_2.

§) Cole, Wadsley and Walkley [2]) Sample B 70.

**) Cole, Wadsley and Walkley [2]) Sample 4.

ed with a sample number. Two samples of natural ores have been examined for comparison with the synthetic oxides, and are referred to by their place names.

X-ray analysis*) was carried out using the Debye-Scherrer technique on G. E. Co. apparatus. The specimens were mounted in collodion as a powder wedge. Exposures were made with unfiltered Fe radiation, the specimen acting as its own filter. Film measurements were made to identify the patterns by comparison with those of pure minerals.

Chemical Analysis. Samples were analysed for total and higher valence manganese and the values of "*n*" in the formula MnO_n are shown in Table I. For total manganese, samples were reduced with sodium sulphite in sulphuric acid, and the SO_2 was boiled off. An aliquot was oxidized with periodate in phosphoric acid, and the permanganate colour was read with an "Eel" photo-electric colorimeter using an "Ilford" Tricolour green filter.

Higher-valence manganese was determined by reducing samples with an excess of standard oxalic acid in sulphuric acid, then titrating excess oxalic with standard permanganate.

POT EXPERIMENTS

The main aim of these experiments was to compare the oxides described above for their ability to supply manganese to oats in soils on which oats normally fail through manganese deficiency. Some of the oxides have also been compared for their ability to supply peas with manganese in the same soils.

The soils used are referred to by their place names and are as follows:

Grey peat from *Rendelsham*, South Australia. Calcareous, overlying limestone; pH 7.9.

Black peat from *Yambuk*, Victoria, Australia. Calcareous, overlying limestone; pH 8.0.

Black clay from *Penola*, South Australia. From reclaimed swamp; pH 6.8.

Chocolate sandy loam from *Mount Gambier*, South Australia. Immature, derived from calcareous volcanic ash; pH 7.4.

All these soils have excellent structure, and are highly permeable to water. Work on the first two soils is here reported for the first time. Work on the Penola and Mount Gambier soils [10]) has been continued and extended.

*) This work was done by Mr A. D. Wadsley of the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation.

The pots were of three sizes. Size I: glazed earthenware holding 20 kg of soil, 22 inches high. Size II: glazed earthenware, holding 4.5 kg of soil, 9 inches high. Size III: enamelled pots holding 1.5 kg of soil, 5 inches high.

All additions of manganese compounds were at the rate of 90 parts per million of Mn, uniformly mixed through the soil. Each pot of soil received an initial surface application of fertilizer adjusted to be equivalent to the rates below:

Superphosphate	330 lb per acre
KNO_3	220 lb per acre
$MgSO_4.7H_2O$	55 lb per acre
$ZnSO_4.7H_2O$	10 lb per acre
$CuSO_4.5H_2O$	10 lb per acre

The plants were grown in the open in a bird-proof enclosure in the grounds of the Agriculture School of the University of Melbourne.

Algerian oats were sown in mid June. Seven seeds were sown in size I and II pots and the number of seedlings was reduced to five. In size III pots, five seeds were sown and the number of seedlings was reduced to three. The plants were harvested in December.

EXPERIMENTS WITH OATS

In exploratory tests with oats in 1947, manganite, bixbyite and dry-way pyrolusite were compared in Rendelsham, Yambuk and Penola soils. Manganese sulphate was included as an additional test in the Yambuk and Rendelsham soils. As these experiments were continued and the results confirmed in 1948, they are discussed with the main experiments of that year, when all the oxides in Table I were used in the Rendelsham and Yambuk soils.

The seed used in 1948 was taken from Mn-deficient oats grown on replicated plots of the sandy loam of the University [9]). Germination was uniformly good, and plants were brairding at the end of June. Plants were classified as "deficient", "healthy" or "mainly healthy".

The "deficient" plants showed grey-speck even on the first leaf; normally the symptoms do not show until the third leaf, but the use of deficient seed led to this earlier appearance. Many deficient plants produced no side tillers, and few produced as many as two. Symptoms of deficiency appeared in every leaf as it was formed. On very severely affected plants the growing tips actually died. Less severely affected plants did not die, but made poor growth, with all leaves developing symptoms.

"Healthy" plants showed no symptoms at any time. "Mainly healthy" plants showed only mild symptoms. These were most evident at the three-leaf stage, presumably because the root system

was not yet adding to the poor reserve of the seed. Later-formed leaves were generally healthy, and the plants made growth comparable with that shown by healthy plants.

All plants remained in the pots until mid-December, when they were harvested by cutting. The yields of straw and grain from deficient plants were negligible. On the other hand, healthy and mainly healthy plants produced good yields of straw and grain.

The results of the experiments with the Rendelsham, Yambuk and Penola soils are summarized in Table II and illustrated in Plates I and II.

TABLE II

Response of Oats in 1948 to various manganese compounds				
Sample No.	Manganese Compound (Additions in 1948 unless otherwise shown)	Response on various Soils		
		Rendelsham	Yambuk	Penola
1.	Manganite (1947)	H	H	H
2.	Hausmannite	D	D	—
3.	Hausmannite	D	D	
4.	Manganous manganite	D	D	—
5.	Manganous manganite	H	H	—
6.	Cryptomelane	MH	D	—
7.	Hausmannite complex	D	D	—
8.	Pyrolusite	H	MH	-
9.	Pyrolusite (1947)	D	D	D
10.	Bixbyite (1947)	D	D	D
11.	Hammersley River Ore	D	D	
12.	Auckland Ore	D	D	—
13.	Guyard product (1937)	—	—	H
	Manganese sulphate (1947)	H	MH	—

H Healthy, MH Mainly Healthy, D Deficient

The Mount Gambier soil was successfully treated in 1934 by adding Guyard product (sample 13), and in another pot, by four weeks waterlogging followed by restoration of drainage. The effect of the Guyard product remained for eight years, but later gradually decreased, until in 1948, oats in this pot were as severely affected with grey speck as those in the control pot. On the other hand, plants grown in soil which had been waterlogged remained healthy (Plate IIB).

Experiments with Peas.

Some less extensive experiments were carried out with peas, during the autumn of 1948.

"Greenfeast" peas were used. Four seeds to each pot were sown on the 3rd February, and the plants grew until 19th May. The pots were given measured amounts of water from time to time.

The plants were grown in those pots of the Yambuk, Rendelsham and Penola soils which had been set up in 1947, and also in pots of the Mount Gambier soil.

Plants in some of the pots of the Yambuk, Rendelsham, and Penola soils showed symptoms of manganese deficiency on the vegetative parts. The first symptoms usually developed at thirty days after sowing, when the growing tip of the main stem became yellow. New growth had meanwhile started from a bud near the base of the stem. During the growth of the first lower lateral, the symptoms on the main stem became more severe. The youngest leaves failed to develop, and growth appeared to stop at about ten days after the onset of symptoms. Older leaves also became yellow and their edges curled backwards. The symptoms at this stage are illustrated in Plate IIIA.

Although the leaves of the first lower lateral were at first green, the growing tip usually developed symptoms of deficiency. The extent and severity of these symptoms seemed to be related to further growth of the whole plant. If a second lower lateral was produced, the symptoms extended to older leaves, whereas if growth of the whole plant stopped at the first lateral stage, the older leaves remained green. None of the plants which showed symptoms reached the flowering stage.

Most workers, in describing manganese deficiency of peas, only refer to the symptom known as "marsh spot", which takes the form of discolouration and partial necrosis of the mature seed. We examined every mature seed and did not find marsh spot in any of our experiments. Either the plants were completely healthy, or on the other hand, they showed symptoms on the vegetative parts, and failed to produce flowers. S a m u e l and P i p e r [11]) found similar results with peas growing in culture solution in the complete absence of manganese. It appears, therefore, that the supply of manganese to plants in the Rendelsham, Yambuk, and Penola soils was extremely small where symptoms on the vegetative parts occurred.

The results of the experiments with the Rendelsham, yambuk and Penola soils are shown in Table III and illustrated in Plates IIIB

and IVA. In all pots of the Mount Gambier soil, plants were healthy in both vegetative and reproductive stages (Plate IVB).

TABLE III

Response of peas in 1948 to various manganese compounds

Sample No.	Manganese Compound	Response on various Soils		
		Rendelsham	Yambuk	Penola
1.	Manganite	H	H	H
9.	Pyrolusite	D	D	H
10.	Bixbyite	D	D	H
13.	Guyard product (1937)	—	—	H
	Manganese sulphate	H	H	—

H: Healthy in vegetative and reproductive stages.
D: Deficiency symptoms in vegetative stage, reproductive stage not reached.

An interesting problem is raised by the different responses of peas and oats to the same soil treatments. In the Yambuk and Rendelsham soils, peas and oats showed deficiency symptoms in pots treated with dry-way pyrolusite and bixbyite, and were healthy in those treated with manganite and manganese sulphate. In the Penola soil, however, peas were healthy in pots treated with dry-way pyrolusite and bixbyite, though oats with the same treatments showed severe grey-speck symptoms. A difference between peas and oats was also shown in the Mount Gambier soil, where peas were healthy yet oats died from manganese deficiency, (compare Plates IIB and IVB).

These pot tests showed that the effects of the manganese oxides ranged from complete success through a borderline effect (cryptomelane) to zero. This raises two problems: firstly, to devise laboratory tests for the degrees of usefulness of the oxides to plants; and secondly, to understand better the differences between the oxides that determine these results.

ACTIVITY OF MANGANESE OXIDES

While many workers have suggested or implied lobaratory methods for measuring activity, only two systematic studies on this subject have been reported. D'Agostino[3]) measured the rate of production of CO_2 ($dv\ dt$) from a mixture of sulphuric acid, oxalic acid and oxide. He obtained a wide range of values, the synthetic oxides giving much higher values than natural ores. Later, Wadsley and Walkley (private communication) used this method in a thorough study of a wide range

of oxides, and obtained large differences in dv/dt between synthetic oxides and natural ores. They also found large differences within these groups but were unable to suggest any correlation with structure, except that pyrolusites are, in general, less active than other types.

Alekseevskii and Frid[1]) have recently compared manganese dioxides for their ability to catalyse the oxidation of carbon monoxide to carbon dioxide and aniline to azobenzene. They devised another surprising test, which was to measure the capacity of an oxide to form a so-called "amalgam", when ground with mercury. This "amalgam" may be no more than the result of the wetting of the powder by mercury, and their formula Hg_2MnO_2 need not be taken seriously. With three different structures, they found the same relative activities in each of the three processes. The most active oxide was prepared in the wet way, and was indentified as α-MnO_2 (cryptomelane). This was highly effective as a catalyst, and reacted immediately on grinding with mercury. The next in order, γ-MnO_2, also prepared in the wet way, was slightly effective as a catalyst and reacted only slowly with mercury. β-MnO_2 (pyrolusite), prepared in the dry way, was always inert. These differences in activity were attributed to structure and particle sizes since the most active oxide had the smallest particles, and the inert pyrolusite had the largest.

Activity in Solution of Quinol.

It has been known for a long time that manganese oxides which occur in soils differ in oxidizing activity. The most active forms are extracted by quinol in a solution of ammonium acetate at pH 7 and can cause a drift in potential with the quinhydrone electrode. Since the health of plants is correlated with the fraction of manganese extracted by a solution of quinol in ammonium acetate [1]*f*) we used quinol for activity tests of manganese oxides in the present work.

Throughout this work, 10.0 mg samples were stirred with 200 ml of 0.05% quinol solutions for the standard time at room temperature. Systems were then filtered, and suitable aliquots taken for determination of manganese by the colorimetric-periodate method, after a preliminary treatment with aqua regia to destroy organic matter.

Normal ammonium acetate containing quinol was used first. With this reagent, the amounts extracted from the three wet-way oxides

shown in Table IV were of the same order. Yet the manganite and pyrolusite were successful in soils, and hausmannite failed. The extracting solution was evidently too drastic, so it was modified first by decreasing the concentration of ammonium acetate and then by simply using quinol in water. The results of Table IV show that

TABLE IV

Manganese extracted from three wet-way oxides expressed as percentage of total, using 10 mg oxide and 0.05% quinol solutions at pH 7.

Sample No.	Structure	With ammonium acetate				Quinol alone	
		1.00 N		0.05 N			
		(*a*)	(*b*)	(*a*)	(*b*)	(*a*)	(*b*)
1.	Manganite	85	100	77	86	23	35
2.	Hausmannite	76	91	36	51	2	8
3.	Pyrolusite	97	100	86	96	n.d.	33

(*a*) 15 minutes contact; (*b*) 60 minutes contact.

hausmannite is the most sensitive to the concentration of ammonium acetate, and that it is inert to quinol alone. The simple solution of quinol gives the best correlation with the pot tests (Table VI) and we have adopted one-hour contact with 0.05% quinol as the standard test for activity in an oxide. The reason why the extraction of the less active oxides with quinol ceases at a figure near 10% is not clear. It seems most likely that this represents the solution of the outermost layers only, and that these are less ordered or less compact than the underlying layers.

Probably any electrolyte will increase the extraction of oxides by quinol, through a neutral-salt effect which displaces the surface manganous ions into the solution and so exposes the fresh layers of the crystal to attack. Calcium nitrate (Tables V and VI) seems to preserve the order of activity of oxides found with quinol alone, but

TABLE V

Manganese extracted from three oxides expressed as percentage of total, using 10 mg oxide and 0.05% quinol solutions at pH 7. One hour contact. All electrolyte solutions are normal

Sample No.	Structure	Ammonium Acetate	Ammonium Nitrate	Calcium Acetate	Calcium Nitrate	Quinol Alone
2.	Hausmannite	91	67	86	9	8
8.	Pyrolusite	100	100	100	52	33
9.	Pyrolusite	87	91	n.d.	25	14

TABLE VI

Structure, composition and crystallinity of various oxides as related to percentage manganese extracted from 10 mg of oxide with solution of 0.05% quinol with one hour contact

Sample No.	Structure	n in formula MnO_n	Crystallinity *)	Percentage of manganese extracted by solutions containing:		
				Normal ammonium acetate	Semi-molar calcium nitrate	Quinol alone
1	Manganite	1.50	Very low	100	47	35
2	Hausmannite	1.35	High	91	9	8
3	Hausmannite	1.35	High	6	7	7
4	Manganous manganite	1.99	Low			25
5	Manganous manganite	1.99	Low	94	78	57
6	Cryptomelane	1.87	Moderate			31
7	Hausmannite complex	1.52	High			7
8	Pyrolusite	1.97	Low	100	52	33
9	Pyrolusite	2.00	High	87	25	14
10	Bixbyite	1.50	High			1
11	Pyrolusite		High			11
12	γ-MnO_2 and cryptomelane		High	78	33	14

*) High crystallinity denotes sharp lines in X-ray patterns, low crystallinity diffuse lines.

it has a levelling effect which obscures the magnitude of the difference in activity, and has no advantage to compensate.

As shown in Table V, both ions of ammonium acetate further increase the attack of quinol on an oxide. The action of ammonium ion is hard to explain. The action of acetate ion appears to be through its ability to form complexes with bi- and ter-valent manganese. With hausmannite, in which manganese is bi- and quadri-valent, there is probably an additional effect in that acetate ions could move reaction (1) to the right by forming a complex with ter-valent manganese.

$$MnO_2 + Mn^{++} + 2H_2O \rightleftharpoons 2MnOOH + 2H^+ \ldots . \qquad (1)$$

Some observations by Dion, Mann and Heintze[5]) may be considered here although the structures of some of their oxides are not clear. It seems most likely, however, that one oxide which they prepared in the wet way and referred to as '$Mn(OH)_3$' was hausmannite. This is indicated by its composition $MnO_{1.36}$ and by an earlier statement that a similar preparation was predominantly

hausmannite [4]). In a mixture with soil, this oxide was similar to our hausmannite (sample 2) in activity towards quinol in neutral solutions of ammonium acetate and calcium nitrate. The origins of two other oxides which Dion, Mann and Heintze identified as hausmannite and manganite are not stated but the inactivity of both towards quinol in ammonium acetate suggests that they were highly crystalline naturally occurring forms (see below).

Activity and Physical Properties.

a) Size of Ultimate Particle. A large specific surface is obviously needed to ensure activity. The size of the ultimate particles of some oxides was studied by means of electron micrographs.

When manganous manganite (sample 5) was heated, it progressively lost oxygen; the product at 500° showed the X-ray lines of cryptomelane, and that at 900° showed lines of hausmannite together with lines of an unidentified structure. The electron micrograph of manganous manganite (Plate V A) shows a fuzzy mass of particles which could not be fully dispersed. Cryptomelane (Plate V B) is somewhat similar, but shows some crystalline form. The ignited hausmannite complex is highly crystalline (Plate VI A). These changes are in the expected direction, and agree with the other observations. Manganous manganite (sample 5) is chemically the most active and is also a good source for oats; the ignited hausmannite complex is chemically inert, and is useless for oats; cryptomelane is intermediate.

The same principle is shown more strikingly by a group of oxides of the same structure, namely the pyrolusites. Sample 8, prepared by hydrolysing $MnCl_4$, consists of minute particles (Plate VI B). Sample 9, prepared by igniting manganous nitrate, is dense and visibly crystalline. The former is chemically active and cures manganese deficiency in oats. The latter is much less active and is useless for oats; its behaviour is similar to that of the pyrolusite ore from Hammersley River. The opinion that pyrolusites rarely cure deficiency (e.g. Dion, Mann and Heintze [4]) p. 20) is probably due to the use either of such ores or of ignited products.

b) Structure. Several more highly oxidized forms — manganite, pyrolusite, cryptomelane, and manganous manganite — are chemically active and available for oats, so long as the ultimate particles are small enough. Hausmannites, however, are inert and

unavailable even when the particles are as minute as in the sample shown in Plate VII. This is the least oxidized of all the structure used here, and its failure conflicts with the common belief that manganese deficiency disease is due to intense oxidation.

c) Degree of Order in Crystal Lattice. Some oxides gave diffuse X-ray lines (Table VI). These could be interpreted in two ways, indicating either a large specific surface, or a disordered crystal lattice. With the most active oxides which have a large specific surface, the disordered crystal lattice (or low degree of crystallinity) need not be brought into the explanation. It is possible, however, for an oxide with large particles to give diffuse lines (e.g. sample 4), and here the low crystallinity does not make it active. What is probably most important for the health of plants is the degree of *surface* disorder, and X-ray lines do not reveal this information.

Acknowledgements.

We are particularly indebted to Mr. A. D. Wadsley and Dr. A. Walkley of the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (C.S.I.R.O.), not only for X-ray information but for many helpful discussions. Dr. A. L. G. Rees of C.S.I.R.O. arranged the production of the electron micrographs and Mr. W. P. Johnston of the University of Melbourne took the photographs.

SUMMARY

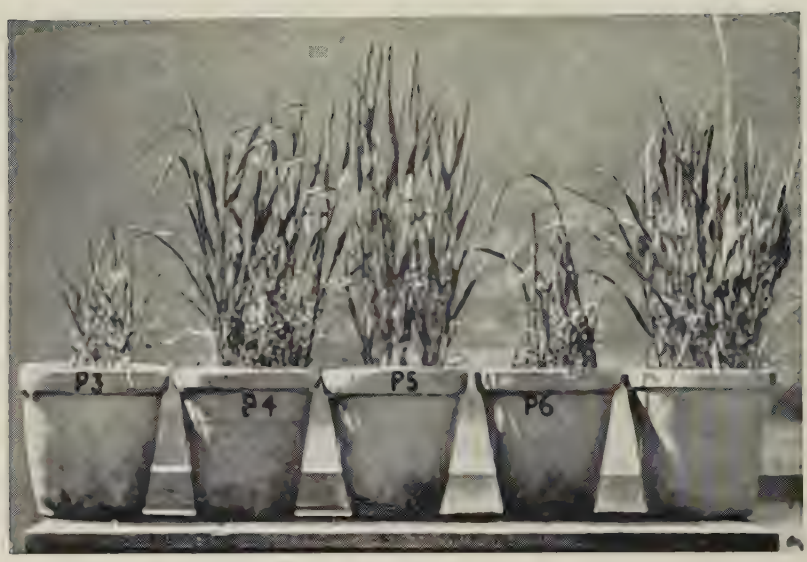
A number of oxides of manganese were prepared and their crystalline structures were indentified by X-rays. They were added to four soils on which plants suffered from manganese deficiency. Oxides of the structures manganite, manganous manganite, and pyrolusite cured manganese deficiency of oats and peas. All the successful oxides consisted of very small particles, as shown by electron micrographs.

The amount of the oxides dissolved by aqueous quinol during an hour at room temperature was correlated with their ability to supply plants with manganese.

Received October 28, 1950.

I *A*. Oats on Yambuk soil. Left to right: control, manganite (added 1947), manganite (1948), manganese sulphate (1947), bixbyite (1947).

I *B*. Oats on Yambuk soil. Left to right: pyrolusite (sample 8), control, manganous manganite (sample 5), hausmannite (sample 2).



II *A*. Oats on Penola soil. Left to right: bixbyite (1947), manganite (1947), Guyard product (1937), control, manganite (1948).

II *B*. Oats on Mount Gambier soil. Left to right: Guyard product (1934), control, waterlogged (1938), waterlogged (1934).

III *A*. Manganese deficiency symptoms on "Greenfeast" pea.

III *B*. Peas on Yambuk soil. Left to right: control, manganite (1947), manganesesulphate (1947), bixbyite (1947).

IV *A*. Peas on Penola soil. Left to right: manganite (1947), Guyard product (1937), control, bixbyite (1947).

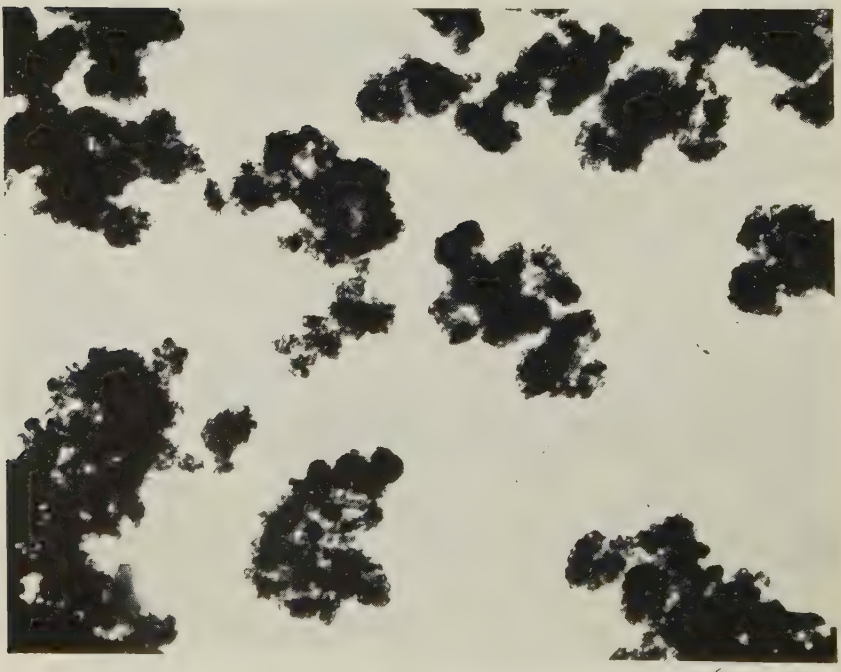
IV *B*. Peas on Mount Gambier soil. Left to right: control, waterlogged (1938).

A. Manganous manganite (sample 5).

B. Cryptomelane.

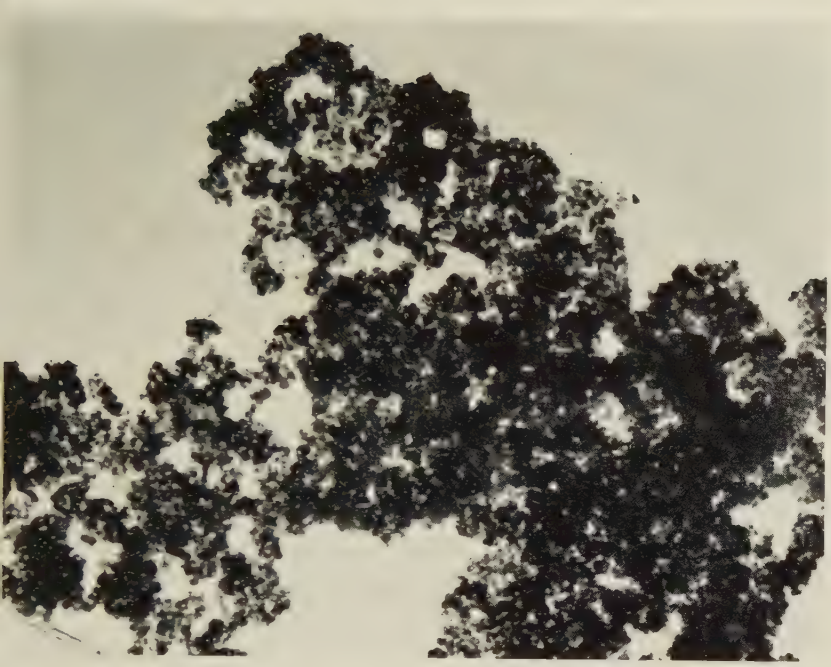
V. Electron micrographs of manganese oxides. × 40.000.

A. Hausmannite complex (sample 7).



B. Pyrolusite (sample 8).

VI. Electron micrographs of manganese oxides. × 40,000.



VII. *A*. Electron micrograph of hausmannite (sample 2). × 40,000.

REFERENCES

1) Alekseevskii, E. V., and Frid, K. V., Study of the sorption and catalytic properties of active manganese dioxide with respect to vaporous and gaseous substances. IV. Catalytic properties of α-, β- and γ-modifications of manganese dioxide. J. Gen. Chem. (U.S.S.R.) **15**, 3–8 (1945). (Translation only seen).
2) Cole, W. F., Wadsley, A. D., and Walkley, A., An X-ray diffraction study of manganese dioxide. Trans. Electrochem. Soc. **92**, 133–154 (1947).
3) D'Agostino, O., Dosaggio del'attivita chimica del diossido di manganese. Ric. Sci. **9** (1), 195–206 (1938).
4) Dion, H. G., and Mann, P. J. G., Three-valent manganese in soils. J. Agr. Sci. **36**, 239–245 (1946).
5) Dion, H. G., Mann, P. J. G., and Heintze, S. G., The 'easily reducible manganese' of soils. J. Agr. Sci. **37**, 17–22 (1947).
6) Dubois, P., Contribution à l'étude des oxydes du manganèse. Ann. Chimie **5**, 411–482 (1936).
7) Feitknecht, W., and Marti, W., Über die Oxydation von Mangan (II)-hydroxyd mit molekularem Sauerstoff. Helv. Chim. Acta **28**, 129–148 (1945).
8) Feitknecht, W., and Marti, W., Über Manganite und kunstlichen Braunstein. Helv. Chim. Acta **28**, 149–155 (1945).
9) Leeper, G. W., Manganese deficiency of cereals: plot experiments and a new hypothesis. Proc. Roy. Soc. Victoria (n.s.) **47**, 225–261 (1935).
10) Leeper, G. W., The forms and reactions of manganese in the soil. Soil Sci. **63**, 79–94 (1947).
11) Samuel, G., and Piper, C. S., Manganese as an essential element for plant growth. Ann. Applied Biol. **16**, 493–534 (1929).
12) Wells, A. F., The structure of metallic oxides. Quart. Rev. Chem. Soc. **2**, 185–202 (1948).

Plant and Soil III, no 2 April 1951

AVAILABLE MANGANESE OXIDES IN NEUTRAL AND ALKALINE SOILS

by L. H. P. JONES and G. W. LEEPER

School of Agriculture, University of Melbourne, Australia

INTRODUCTION

The problem of estimating the available manganese in soil is as complex as that of estimating any other element. The following contribution towards solving the problem is closely related to the preceding paper.

Since active MnOOH or MnO_2 can cure manganese deficiency of oats and peas on naturally deficient soils *), it seems that we should look for such oxides in estimating available manganese in neutral or alkaline soils. The soils that were cured with active oxides did not increase in exchangeable manganese (which was about 1 p.p.m.), and earlier work [5]) has shown no difference in exchangeable manganese between deficient and healthy soils. A likely reason is that the manganous ion is hardly mobile in this pH range. The usefulness of an active oxide must depend on having a large total area of contact with the root system, and this should apply also to the only slightly mobile exchangeable ion.

It is true that manganous ion may be the basis of success when a deficient soil is cured either by adding a strong reducing agent or by sterilization. (These two treatments sometimes coincide, since a strong reducing agent must alter the microbial flora). Thiosulphate [8]) and quinone [10]) have both cured deficiency disease for a time, presumably by increasing the exchangeable manganese. Bactericides, as used for example by T i m o n i n [11]), may sometimes work by preventing bacterial oxidation and so stabilizing the bivalent ion at a higher level. However, such success has misled some workers into

*) The terms "deficient" and "healthy" are used throughout this paper to describe soils on which oats are respectively subject to and free from manganese deficiency disease.

believing that a store of the bivalent ion is needed for health — a belief that is incompatible with our analyses.

The manner in which the manganese is taken up from oxides by the root may be left an open question for the present. The mechanism *must vary* among the different species. Peas, for example, can use oxides that are less active than those required by oats, and other plants are more efficient than peas. This may be because the rhizosphere flora are different, or because of root excretions, or because of a different absorbing mechanism at the surface of the root. In any case, what we most need to know is the total surface area of manganese oxide of the necessary activity.

ESTIMATION OF AVAILABLE MANGANESE OXIDES

A solution of ammonium acetate and quinol generally extracts 100 parts per million (p.p.m.) of manganese from healthy alkaline soils, and less than 25 parts from deficient soils [6]). However, while the correlation with the health of oats is generally good, there are exceptions; in particular, this solution extracts much manganese from some of our deficient soils to which ineffective oxides have been added. Further, as already shown [4]), this solution can dissolve hausmannite, which is useless for oats. It appears that the simultaneous use of quinol and electrolyte, and in particular the use of ammonium acetate contribute to this drastic effect. In order to avoid these faults, an alternative method has been devised whereby the reducing agent is separated from the electrolyte and ammonium acetate is replaced by calcium nitrate.

6 g of air-dried soil was stirred for half an hour with 60 ml of 50% aqueous alcohol containing 0.05% quinol, the alcohol being used to flocculate the colloids. Quinol was removed by washing three times with 50% aqueous alcohol, using a centrifuge. The suspension was centrifuged and filtered. The alcohol filtrates contained no manganese and were discarded.

The manganese now present as the exchangeable ion was replaced with a solution of semi-molar calcium nitrate solution at pH 7. The soil was shaken with 60 ml of solution for one hour and then leached with six successive 20 ml lots of solution. The manganese in the filtrate was estimated by the colorimetric periodate method.

The results obtained by this method (Table I) give the best correlation with the health of oats that we have yet found. The

TABLE I

Manganese extracted in 1950 from healthy and deficient soils using quinol together with, or followed by electrolytes

Sample and structure *)	Growth † 1950		Mn extracted p.p.m. of soil by various methods					
			Rendelsham Soil			Yambuk Soil		
	R	*Y*	(*a*)	(*b*)	(*c*)	(*a*)	(*b*)	(*c*)
Untreated	D	D	2	2	3	12	13	20
1. Manganite	H	H	18	25	28	27		
4. Manganous manganite (1947)	D	D	6	26	24	12		
5. Manganous manganite	H	H	28	44	77	50	61	98
6. Cryptomelane	MH	D	18	54	57	20	65	75
7. Hausmannite complex	D	D				13		
8. Pyrolusite	H	MH				25	71	83
9. Pyrolusite (1947)	D	D	3	20	6	10	42	25
12. Auckland Ore Manganese Sulphate (1947)	D	D				12	51	46
	H	MH	43		66			

*) Additions in 1948 unless otherwise shown.

†) R Rendelsham soil; Y Yambuk soil.
H Healthy, MH Mainly Healthy, D Deficient.

(*a*) Shaken with alcoholic 0.05% quinol, washed with alcohol, extracted with semi-molar calcium nitrate.

(*b*) Extracted with molar ammonium acetate plus 0.2% quinol; half hour shaking.

(*c*) Extracted with semi-molar calcium nitrate plus 0.2% quinol; half hour shaking.

boundary between healthy and deficient soils is between 15 and 20 p.p.m. A clear-cut division should not be expected, since the growth of oats ranged from deficient through "mainly healthy" to healthy [4]).

This method has also been applied to (I) the deficient sandy loam of the University of Melbourne [5]) and (II) the deficient sandy loam from Mount Gambier [4]). The University soil has 13 p.p.m. whereas healthy plots to which half a ton per acre of manganese salts have been added have 49 p.p.m. manganese. The Mount Gambier soil has 4 p.p.m. as compared with the mainly healthy pot which was waterlogged in 1938 and which now has 22 p.p.m.

The separation of quinol and calcium nitrate ensures that the test is confined to the outermost layers of the oxides. The manganese extracted from these soils with oxides of composition Mn_2O_3 to MnO_2 must therefore reflect the surface area and surface disorder of the crystals.

DISAPPEARANCE OF ACTIVE OXIDE

It might seem foolish to try to cure a deficient soil permanently by adding manganese, even in the most efficient form. All the manganese already in that soil has presumably gone through the cycle that leads to unavailability; surely this must also be the fate of the next 50 pounds?

The question is difficult to answer in general terms, since the time needed for such a reversion is variable or unknown. Experimentally, manganese salts in various parts of the world have brought about everything from a lasting cure to a fleeting improvement which disappears within two years. Since the element will be quickly oxidized in the soil in any case, we have concentrated attention on the higher oxides. Among these 90 p.p.m. of manganese added as Guyard product in 1937 [4]) to the Penola soil has succeeded for 13 years, and up to date in our pot tests there has been only one example of reversion of an active dioxide, namely on Mount Gambier soil after 8 years [6]). Manganite, containing tervalent manganese, has reverted slightly in the third year in Rendelsham and Yambuk pots, but not in Penola.

Reversion of an oxide may be pictured in one of the following ways:

1. The particle of manganese oxide remains the same size but ages and forms a more ordered or less active surface.

2. Organic molecules forming chelate linkages with manganese cover the original surface in much the same way as a flotation agent covers a mineral grain.

3. The manganese goes entirely into the cycle in the soil, the original grain of oxide disappearing, and eventually the element collects into crystals of an inactive oxide, which may be macroscopic.

4. The manganese goes into the cycle and is bound up with organic matter to form an insoluble complex.

The first way seems the most generally likely. Any "aging" by recrystallization has only to affect the surface layers in order to lower availability, since we are concerned with the interface of root and soil. The third way may be important on some periodically waterlogged soils, in which manganese can most readily migrate and form concretions at a few favoured sites. The second and fourth ways (dealt with below) seem to us less plausible.

Two manganese cycles of a speculative nature have been suggested [1]) [2]). The evidence for these is not convincing. The only

established changes are those of oxidation and reduction, both biological and non-biological. To these we must surely add aging and its converse, weathering. If aging can explain the poor residual effect of some active oxides on some soils, we are still left with the unsolved problem why such reversion has not occurred, for example, on the Penola soil.

While it seems likely that the oxides remain in their highly oxidized state after losing their ready availability, it is also conceivable that some manganese becomes unavailable in some other state, after entering the cycle by reduction. An opinion which is often implied rather than stated in so many words, is that manganese may become inactive by combining with organic matter. This explanation of deficiency is applied especially to alkaline peats. It may be thought of in two ways: firstly, that exchangeable manganese is held particularly tightly by organic colloids; secondly, that some organic molecules form insoluble chelated complexes, in which the metal is not exchangeable.

An example of the first line of thought is given by Steenbjerg [9]) who found that many humic sands of pH over 7 released their exchangeable manganese only slowly when they were leached with semi-molar calcium or magnesium nitrate. At the same time, in our experiments, when high-organic soils were mixed with manganous sulphate and leached three to six hours later with calcium nitrate, at least half the manganese was recovered.

There is no doubt that some soil colloids compete strongly with roots for adsorbed ions, and in marginal cases this effect might cause deficiency. However, an organic molecule that formed an insoluble complex could lower the availability far more. The main evidence for such a reaction was given by Heintze and Mann [3]) who found much manganese together with organic matter in the aqueous extract of a fen soil previously saturated with sodium. In our own experiments we have found no such evidence for the existence of such complexes, and this part of the problem remains obscure.

There is serious difficulty in interpreting many published figures for manganese extracted from neutral or alkaline soils. Ammonium acetate, besides releasing the exchangeable cation, may also dissolve higher oxides as complex acetates. In any alkaline system, bivalent manganese may be formed from higher oxides during the

experiment by the action of the organic matter which becomes strongly reducing at a high pH (M a t t s o n [7]) p. 301).

SUMMARY

The available higher oxides of manganese in neutral and alkaline soils are estimated by first treating with alcoholic quinol, then washing with alcohol, and finally extracting with semi-molar calcium nitrate. Healthy soils contain from 20 to 50 p.p.m. of manganese so extractable.

The manganese cycle consists simply of oxidation and reduction, together with aging of oxides. Aging is the most likely mechanism by which added manganese compounds become less available with the passage of time.

Received October 28, 1950.

REFERENCES

1) D i o n, H. G., and M a n n, P. J. G., Three-valent manganese in soils. J. Agr. Sci. **36**, 239–245 (1946).
2) F u j i m o t o, C. K., and S h e r m a n, G. D., Behaviour of manganese in the soil and the manganese cycle. Soil Sci. **66**, 131–145 (1948).
3) H e i n t z e, S. G., and M a n n, P. J. G., Studies on soil manganese. J. Agr. Sci. **39**, 80–95 (1949).
4) J o n e s, L. H. P., and L e e p e r, G. W., The availability of various manganese oxides to plants. Plant and Soil. **3**, 141–153 (1951).
5) L e e p e r, G. W., Manganese deficiency of cereals: plot experiments and a new hypothesis. Proc. Roy. Soc. Victoria (N.S.) **47**, 225–261 (1935).
6) L e e p e r, G. W., The forms and reactions of manganese in the soil. Soil Sci. **63**, 79–94 (1947).
7) M a t t s o n, S., E r i k s s o n, E., and V a h t r a s, K., Effects of excessive liming on leached acid soils. II. Forms of manganese. Kgl. Lantbruks-Högskol. Ann. **15**, 291–307 (1948).
8) Q u a s t e l, J. H., H e w i t t, E. J., and N i c h o l a s, D. J. D., The control of manganese deficiency in soils. 1. The effects of sulphur and thiosulphates on crops growing on manganese-deficient soils. J. Agr. Sci. **38**, 315–322 (1948).
9) S t e e n b j e r g, F., Undersøgelser over Manganindholdet i dansk Jord. I. Det ombyttelige Mangan. Tidsskr. Planteavl **39**, 401–436 (1933).
10) S t e e n b j e r g, F., Undersøgelser over Manganindholdet i dansk Jord. II. Det ombyttelige Mangan og dets Afhaengighed af Gødskning og Jordbehandling. Tidsskr. Planteavl **40**, 337–371 (1934).
11) T i m o n i n, M. I., Microflora of the rhizosphere in relation to the manganese-deficient disease of oats. Soil Sci. Soc. Am., Proc. **11**, 284–292 (1947).

Plant and Soil III, no 2 April 1951

WATER TRANSPORT IN THE XYLEM AS RELATED TO CALCIUM UPTAKE BY GROUNDNUTS (ARACHIS HYPOGAEA L.)

by L. K. WIERSUM

Botanical Institute, General Agricultural Experiment Station, Bogor

INTRODUCTION

The phenomenon of geocarpy has long attracted the attention of botanists but until quite recently there have been very few investigations into the physiology of these fruits.

In 1914, Van der Wolk [18] [19]), published the results of his investigations into the fruiting of *Arachis hypogaea* and *Voandzeia subterranea*. In a series of well designed experiments he was able to elucidate a number of factors which determined fructification in these crops. Essential requirements proved to be darkness, moisture and certain elements present in the soil. The presence of root hair like protuberances on gynophore and fruit [14]) suggested to him that these fruits absorbed from the soil, substances necessary for their growth.

This last conclusion did not attract the attention it might have done especially when Shibuya [16]) who repeated a number of his experiments, besides designing new ones, came to quite the opposite conclusion regarding the influence of soluble substances from the soil on fructification. Shibuya however used tap water as the medium into which the gynophores were led and he did not allow for the fact that this is definitely not free of solutes.

Agricultural field experiments and general experience in the growing of groundnuts led to further investigations into the supply of mineral elements to the fruit. Whilst liming often proved beneficial (this is not surprising since most legumes absorb large quantities of calcium) it was found that higher yields were not always obtained, the results varying according to the particular fertilizer used and the time of application [4]) [15]). This was particularly the case in the

large groundnut growing areas of the U.S.A. After a number of investigations into this problem it was concluded that good fruiting, particularly seed formation, could only be obtained in a soil containing a fair amount of available calcium in the upper layers [5] [7]. In a number of cases it was found that the calcium status of the rooting zone permitting good vegetative growth of the crop need not be as high as that necessary in the fruiting zone for good fruiting. The findings varied according to the particular strain of groundnut used. Here again is suggested an absorptive capacity on the part of the gynophore and young fruit. The use of "tagged" calcium in recent experiments has proved conclusively that calcium is absorbed by both "peg" and fruit. These experiments have also shown that hardly any calcium is transported to the fruit from the vegetative parts of the plant [7] [1].

Results published so far clearly point to the fact that, as far as calcium is concerned, the vegetative parts of the groundnut plant are supplied from the roots. The "peg" and fruit however do not receive calcium from the stem and are therefore forced to absorb this essential element themselves. As far as the other elements are concerned, these are for the most part supplied to the fruit from the vegetative parts and thus pass downwards along the gynophore [2]. This rather extraordinary behaviour on the part of calcium attracted the attention of the writer who, unaware of any research into this phenomenon, postulated the question "What is the physiological basis for the inadequate supply of calcium to the fruit in contrast to the other nutrient elements?"

MATERIAL

All experiments have been carried out with the groundnut variety "Schwarz 21" this being a widely propagated strain used by the Agricultural Extension Service in Indonesia because of its resistance to *Bacterium solanacearum*.

PRELIMINARY EXPERIMENTS

It was considered necessary to carry out a number of simple experiments designed to check previously published findings and to verify the essentiality of calcium in the fruiting zone for this strain of groundnut. The developing "pegs" of a few plants were therefore led into test tubes instead of being allowed to grow into the soil. The tubes were either empty or filled with either ground

glass particles previously washed with acid and ammonia or glass particles mixed with gypsum and absorbent carbon. The absorbent carbon was added as a buffer substance to prevent any detrimental effects due to the single added salt. The tubes were then placed in larger tubes which were painted black and sealed with cotton wool plugs, the whole assembly then being inserted into the soil surrounding the plants.

The results obtained fully confirmed previous findings. More or less fully developed fruits were obtained only in the presence of calcium, no fruits developing in the calcium free media. In the absence of calcium only slight elongation of the gynophores was observed and in only two out of eleven cases, some swelling of the tip. "Pegs" emerging from the same plants and which had grown into the soil, all bore fruits of varying maturity. This showed that the plants were in a normal and healthy condition. the calcium factor alone determining fruiting in this case.

Experiments were then carried out to check the course of the transpiration stream. A few of the lateral roots were carefully excavated, cut open and placed in a solution of eosin or neutral red. Subsequent examination showed that the red colour could be traced into the wood vessels of the stems whereas the xylem of the "pegs" remained colourless *unless the fruits were exposed to the air*. This suggests that there is a sap movement in the direction of the ripening fruit only when the latter is allowed to transpire freely.

Other investigations were made to confirm this observation. Four plants were washed free of soil and the cut roots placed in an eosin solution. In two plants the fruits were allowed free access to the air, in the other two the fruits were covered with a wet cloth so as to keep them in a water saturated atmosphere. Only where the developing fruits were able to transpire was the red colour detectable in the "pegs". This observation also shows that the xylem conducting systems of stem and "peg" are in open connection with each other. Even more conclusive proof of this was obtained by allowing Fast Green to enter the roots and exposing the fruits to air. Even after a few hours, a blue coloration could be observed in the veins of the shell.

CRITICAL EXPERIMENTS

Any experimental technique adopted has to satisfy the following conditions:

(1) "Pegs" and groundnut must be able to develop under conditions as normal as possible and must not be disturbed during the experiment.

(2) The greater part of the root system must be accessible so that the roots can be cut to expose the xylem and allow the entry of the dye.

The following arrangement fully satisfied these conditions:

A flower pot of approximately 13 cm upper diameter was filled with a juvenile red lateritic soil, the common local soil in Bogor (formerly Buitenzorg). One groundnut plant was grown in this pot and the pot placed in a

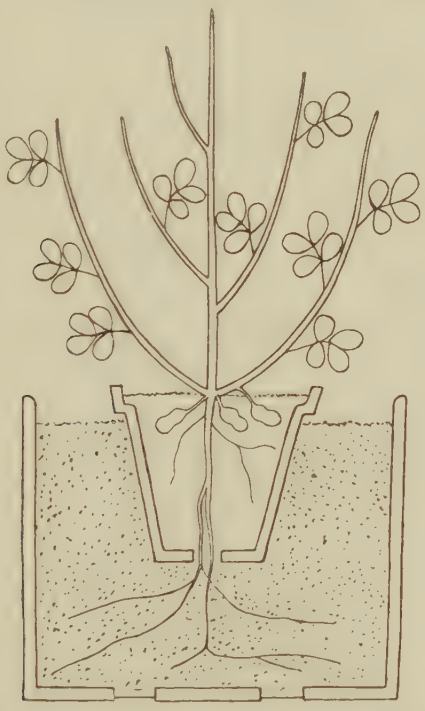


Fig. 1. Method of cultivating the groundnut plant. Inner pot containing pegs, fruits and some roots in lateritic soil. Outer pot with sand and protruding roots.

larger square pot measuring about 30 × 30 × 30 cm. This was filled with a dark grey juvenile volcanic sand to facilitate the removal of the inner pot complete with soil, plant and protruding roots. The protruding roots growing through the hole at the base of the inner pot into the sandy medium could easily be washed free of adhering sand (cf. Fig. 1).

A glass cylinder was filled with dye solution, the pot containing the plant placed on top and the protruding roots immersed in the solution. A large part of the exposed root system was then cut off to enable the dye to be sucked up into the xylem vessels and so indicate the course of the transpiration stream in the plant (cf. Fig. 2).

In all experiments the dye used was Fast Green since this proved to be very satisfactory in penetrating the tissues over long distances. The dye was usually dissolved in rain water, the concentration of the solution ranging from 10 to 100 p.p.m. After a given interval of time, the degree of penetration of the due into the plant was followed by cutting through the internodes and noting the colour of the wood vessels. The gynophore was usually cut at the base of the fruit or near the expanding tip.

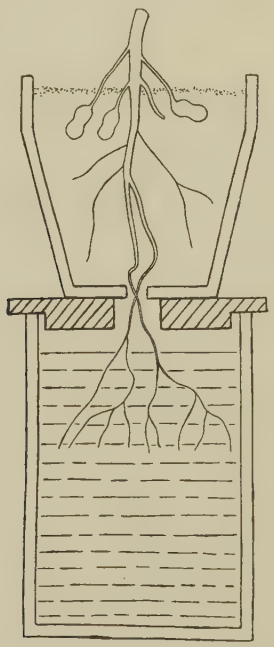


Fig. 2. Experimental set-up during the period the dye is allowed to penetrate into the plant from the cut roots.

Before starting these experiments (they usually lasted two days) the soil in the pots was allowed to dry out thoroughly. This was done to place the young fruits in an extremely dry condition — a state which rarely occurs in the field. At the end of the two day period, the vegetative parts of the plant had often lost their turgidity. The plants were about $2^1/_2$ to 3 months old and all possessed young "pegs" besides mature fruit.

In most of the experiments the blue coloration could be detected in the wood vessels far up into the stem and occasionally in the leaves but in no case was the dye ever found in the fruit. Even the base of the "peg", a few millimetres distant from the stem, showed no trace of Fast Green. The result of a typical experiment is illustrated in the diagram, fig. 3. No dye was detected in the 25 gynophores although the stems were coloured almost to their tips.

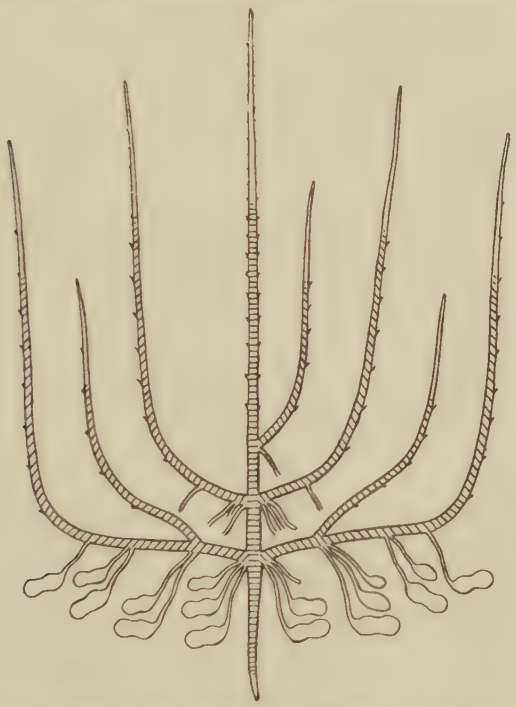


Fig. 3. Diagram showing the penetration of the dye in a single experiment.

There were however some exceptions — 10 pegs out of a total of 68 showing a blue coloration in the xylem. Such deviations only occurred when the fruits were exposed to the air or when an excessive loss of water from the whole plant resulted in a severe transpiration stress. When the soil was kept moist, as in certain other experiments, no exceptions were found.

Finally an experiment was designed to investigate the possibility of water moving in the gynophore towards the stem. A few plants were washed free of soil, placed with their roots in water and the

young fruits and "pegs" immersed in a solution of a substance which could be used as our indicator. Dye solution was not suitable since the excessive absorption by the outer tissues of the shell made penetration into the vessels impossible. Tests were therefore made using a solution of potassium ferrocyanide, $K_4Fe(CN)_6$. After two days the plants were thoroughly washed and sections cut from various internodes along the stem. The indicator was detected by the addition of a drop of $FeCl_3$ solution to the sections. By this means it was possible to detect a small amount of ferrocyanide in the gynophores and in the stem xylem up to two internodes above the insertion of the "peg". The ferrocyanide could only have reached these regions by conduction in the stream of water moving in the same direction.

All these findings clearly lead to the conclusion that, under normal conditions such as prevail in the field, no water enters the gynophore from the stem nor moves in the direction of the fruit. Demonstration of the uptake of water by the "peg" and growing fruit once more confirms earlier opinions and investigations [14] [17] [16]. If the soil is wet, the possibility must be borne in mind, of water even moving upwards in the xylem of the "peg".

DISCUSSION

The question we have been trying to answer is "how can we explain the inadequate transport of calcium to the growing fruit"? The first thing to be considered is the path of this element in the tissues: these may be parenchyma, xylem or phloem.

In view of the length of the "pegs" and evidence concerning the slow transport of solutes in parenchymatous tissue, it is most improbable that this tissue is sufficient for the purpose.

In ordinary cases, the xylem vessels conducting a stream of solutes absorbed by the roots, would transport a fair amount of calcium, along with other mineral elements, to the fruit. All published evidence points to this tissue as the main path of conduction of mineral solutes [8]. In our experiments however we have shown that no water moves to the fruit in this way. This behaviour of the sap stream must also apply in the field since the experiments were conducted under extreme conditions. In this case therefore no calcium can be transported along the xylem vessels to the developing fruit.

There remains then the phloem as the tissue responsible for the

transport of calcium to the developing "peg". According to the literature, most research in this field has been concerned with the transport of organic substances although inorganic solutes have also been considered. For a comprehensive review of this work we refer the reader to Curtis[6]). Miller[12]) also cites a number of references.

All the evidence concerning calcium shows that after being conducted upwards, along with other minerals, and absorbed in the living tissues of the shoot, it then remains highly immobile. Investigations into the movement of solutes prior to leaf abscission show that, in contrast to the behaviour of potassium, phosphorus and nitrogen, no calcium is translocated back from the leaves. In their extensive studies on translocation in the cotton plant, Mason and Maskell[10]) came to the conclusion that there was no evidence for the downward movement of calcium in the bark. The relative immobility of calcium [11]) was also shown in investigations into the loss of solutes by the plant as a result of downward transfer to the roots and subsequent exosmosis into the root medium [3]) [9]).

Consideration of these facts suggests that the phloem is unable to conduct sufficient calcium to the gynophore although it does appear to transfer all other substances necessary for the growth of the groundnut. This means that none of the three tissues is able to ensure a supply of calcium to the fruit, sufficient for its development and particularly for that of the seeds. The only remaining possibility therefore appears to be that the fruit absorbs its calcium direct from the soil, a phenomenon which was clearly demonstrated by previous investigators.

The question arises therefore as to whether transport in the gynophore follows a pattern closely related to the scheme first proposed by Münch[13]). Münch suggested that all solutes necessary for the growth of a fruit are conducted along the sieve tubes, according to a process he calls "mass flow". After their arrival at the "sinks", the organic solutes are mainly converted into insoluble substances, thus releasing the water carrying the dissolved substances and also water resulting from their condensation. The quantity of water so released more than meets the requirements for cell growth, the surplus therefore passing out by way of the xylem unless transpiration requires a supply of water greater than that conveyed by the phloem.

It may well be worthwhile considering the possibility of a substantiation of the Münch hypothesis in this particular case. It seems reasonable to assume that the soil surrounding such geocarpic fruits restricts transpiration to such an extent that a flow of water in the xylem towards the stem is possible and could in fact be demonstrated.

SUMMARY

Recent investigations have shown that the gynophore and young fruit of the groundnut must themselves absorb the calcium necessary for their growth. Since this is not the case for other minerals, experiments were conducted to find the reason for this inadequate transfer of calcium from stem to developing fruit.

The course of the transpiration stream was followed by cutting off part of the root system to obtain penetration of a dye solution into the tissues. It was shown that even in a very dry soil, no water moves along the xylem vessels towards the expanding tip of the "peg".

An explanation is offered for the extra-ordinary behaviour of calcium in view of the fact that whilst the xylem is considered to be the main path of conduction for this element the stream of water necessary for its transport is absent.

Received October 31, 1950.

REFERENCES

1) Bledsoe, R. W., Comar, C. L. and Harris, H. C., Absorption of radioactive calcium by the peanut fruit. Science **109**, 329–330 (1949).
2) Bledsoe, R. W. and Harris, H. C., The influence of mineral deficiency on vegetative growth, flower and fruit production, and mineral composition of the peanut plant. Plant Physiol. **25**, 63–77 (1950).
3) Burd, J. S., Rate of absorption of soil constituents at successive stages of plant growth. J. Agr. Research **18**, 51–72 (1919).
4) Colwell, W. E. and Brady, N. C., The effect of calcium on yield and quality of large-seeded type peanuts. J. Am. Soc. Agron. **37**, 413–428 (1945).
5) Colwell, W. E. and Brady, N. C., The effect of calcium on certain characteristics of peanut fruit. J. Am. Soc. Agron. **37**, 696–708 (1945).
6) Curtis, O. F., The translocation of solutes in plants. London (1935).
7) Harris, H. C., The effect on the growth of peanuts of nutrient deficiencies in the root and the pegging zone. Plant Physiol. **24**, 150–162 (1949).
8) Hoagland, D. R., Lectures on the inorganic nutrition of plants. Waltham Mass. (1948).
9) Luttkus, K. und Böttticher, R., Über die Ausscheidung von Aschenstoffen durch die Wurzeln. Planta **29**, 325 (1939).

10) Mason, T. G. and Maskell, E. J., Further studies on transport in the cotton plant. I. Preliminary observations on the transport of phosphorus, potassium and calcium. Mem. Cotton Res. Stat. Trinidad, Ser. B. no. **5**, 126–173 (1934).
11) Mason, T. G. and Phillis, E., The migration of solutes. Botan. Rev. **3**, 47–71 (1937).
12) Miller, E. C., Plant physiology. New York (1938).
13) Münch, E., Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena (1930).
14) Pettit, A. S., *Arachis hypogaea* L. Mem. Torrey Bot. Club 4, 275–296 (1895).
15) Reed, J. Fielding and Cummings, R. W., Use of soluble sources of calcium in plant growth. Soil Sci. **65**, 103–109 (1948).
16) Shibuya, T., Morphological and physiological studies on the fructification of peanut. Taihoku Imp. Univ., Mem. Faculty Sci. and Agr. **17**, 1–120 (1935).
17) Waldron, R. A., The peanut, its history, histology, physiology, and utility. Contr. Bot. Lab. Univ. Pennsylvania **4**, 302–338 (1919).
18) Wolk, P. C. v. d., Researches concerning geocarpy. In: Publications sur la physiologie végétale. II. Nimègue (1914).
19) Wolk, P. C. v. d., Een en ander over de aanaarding van katjang Bogor (*Voandzeia subterranea*) (1915).

Plant and Soil III, no. 2 April 1951

THE BIOLOGICAL DETOXICATION OF HORMONE HERBICIDES IN SOIL

by L. J. AUDUS

Botany Department, Bedford College, University of London, England

INTRODUCTION

It is now a commonplace that the persistence of the substituted phenoxyacetic acids in soils for considerable periods of time is of vital importance for their practical applications as herbicides. It is equally important however that this toxicity should not last indefinitely, especially if crops susceptible to the herbicide are subsequently to be grown and it is fortunate that certain natural agents combine to remove such toxicity over periods of time which vary with conditions. One of these factors is leaching by rain and the rate of detoxication due to this cause will obviously be closely correlated with the intensity of the rainfall. Herbicides disappear however from normal moist soil in the absence of leaching and it has been widely assumed, but without conclusive evidence, that this detoxication is due to the activity of soil microorganisms. In a previous introductory paper (A u d u s [2]) the author has presented indirect evidence that this is indeed the case in the breakdown of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (subsequently in this paper to be called 2,4-D) in garden soil. Using a modification (A u d u s [1]) of the soil perfusion or percolation technique of L e e s and Q u a s t e l [13]) samples of garden loam were continuously percolated with an aerated solution of 2,4-D (concentration 100 parts per million) for considerable periods and the change of concentration of 2,4-D in the perfusate followed from day to day. Three phases could be recognised in the time course of these changes. Firstly there was an indication of a small immediate drop in concentration when the perfusate was first added to the dry soil and this was assumed to be due to adsorption onto soil colloids. Secondly there was a long period of from 10 to 14 days during which no changes in concentration were

discernable. Finally a third phase of 1 to 3 days' duration was marked by a rapid and complete disappearance of the 2,4-D. Subsequent additions of fresh perfusate resulted in a steady rapid detoxication completed in 1 to 2 days. These kinetics of 2,4-D disappearance, involving a long lag period, are consistent with the hypothesis that the perfusion induces or facilitates the proliferation of a soil organism adapted for 2,4-D breakdown and that the detoxication curve is a reflection of the growth curve of that organism. These results have subsequently been confirmed in independent work by Newman and Thomas [16] using a soil incubation instead of a perfusion technique. It is obviously therefore a general phenomenon not confined to these particular conditions of perfusion.

This however does not constitute proof of microbial attack on the herbicide molecule and, as was pointed out in the first paper, such proof should be provided by studies of the effects of bacterial poisons on detoxication. The experiments which are described in this paper have been concerned with establishing this proof, with attempts at the isolation of an effective organism or organisms and with a preliminary study of the effect of the enrichment flora produced by one hormone herbicide on perfused solutions of other herbicide analogues. It was hoped by these latter experiments to throw some light on the possible biochemical mechanisms of breakdown.

THE PERFUSION TECHNIQUE AND THE BIOLOGICAL ASSAY OF HERBICIDES

The perfusion technique used in these experiments was the same as that employed in the preliminary work previously described. Reference should be made to the original papers for details (Lees and Quastel [13]; Audus [1] [2]). The soil employed was garden loam from a restricted area in the grounds of Sussex Lodge, Regent's Park, London. (The preliminary experiments had been made on soil from a Cardiff source). Samples for perfusion were of 50 g of the 1 – 4 mm fraction of sieved air-dried soil. The initial perfusion of this soil was with 250 ml of the herbicide solution made up in glass distilled water to a concentration usually of 100 parts per million. The rate of liquid perfusion approximated to 500 ml per hour with a corresponding aeration rate of 2½ to 3 litres per hour of filtered air from outside the laboratory. Perfusion temperatures were those of the laboratory, i.e. 16 –18°C. Subsequent perfusions, after enrichment with any one

herbicide molecule, were carried out by allowing the soil to drain for about half an hour, replacing the detoxicated perfusate by a fresh solution and then recommencing the perfusion. This resulted in some inevitable dilution of the perfusate with soil water. The changes in the hormone concentration in the perfusate brought about by such dilutions was of the order of about 10 to 12%. A complicating factor for which it has been necessary to compensate in experiments of long duration (some initial perfusions have run continuously for up to seven months or more), is the slow evaporation of the perfusing solution. This has averaged out at about 0.5 ml per day in the present series of experiments. Such evaporation has been made good by the addition of glass distilled water at frequent and regular intervals so that the height of liquid in the reservoir funnel remains at a constant level. This means that over the course of a long perfusion, where samples of 1—2 ml are removed from the reservoir at regular intervals, a slow decline in the concentration of the constant volume perfusate will result from sampling alone. In such experiments, where this effect assumed a magnitude comparable with concentration changes due to other causes, attention is drawn to it in the relevant results.

The determination of hormone concentrations in the perfusate was by a biological assay technique based on the growth inhibition of roots of garden cress (*Lepidium sativum*). The basic principles of this assay have already been described (A u d u s and Q u a s t e l [4]). In its original form it was susceptible of large errors and certain modifications have been introduced in order to increase its accuracy and to simplify the rather time-consuming technique. It may be of advantage to workers in similar fields of research if full details of the method are described.

The growth vessels used were $\frac{3}{4}'' \times 6''$ rimless pyrex test-tubes. In the earlier technique 20—30 cress seeds were sown on thin thimbles of glass wool making close contact with the meniscus of 15 ml of water culture solution contained in this tube. Such a method produced very erratic growth variations as between comparable tubes and this was traced back to variations in oxygen content of the culture medium. In many experiments roots ceased growth after reaching a depth of 2 cm or so below the surface and the tips became rather swollen and bent. A similar response to partial anaerobic conditions has been observed in *Zea Mays* roots by K a n d l e r [12]). In order to ensure maximum aeration of the growing root, seeds were sown on

the filterpaper support illustrated in Figure 1. 5 ml of the culture solution were placed in the test-tube and the filter-paper support rapidly became soaked in this liquid. 20 seeds were sown in the annu-

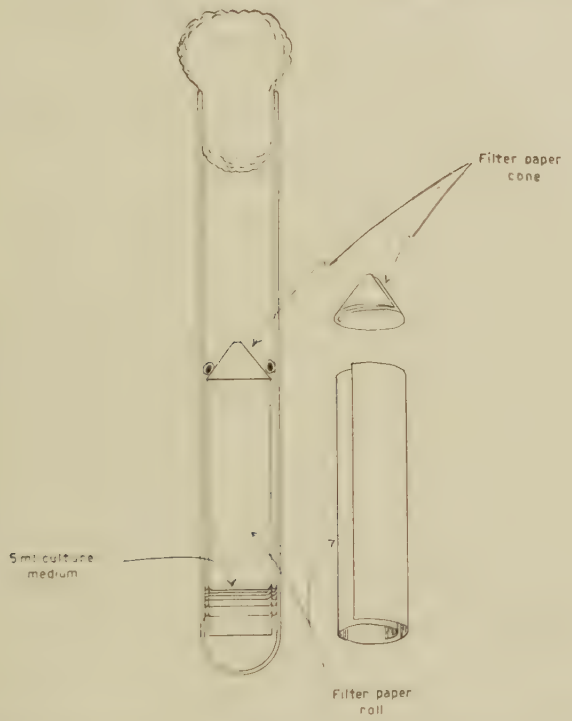


Fig. 1. Method of growing cress (*Lepidium sativum*) seedlings in water culture for herbicide assay.

lar groove made by the filter-paper cone and the test-tube and easily absorbed water from the paper. The emerging radicle grew vertically down between the paper roll and the glass. No growth symptoms of oxygen lack have been observed with this technique. The culture medium was the same as that previously used, i.e. the medium of Nutman, Thornton and Quastel[17]), except that the pH was adjusted to 6.0 and a full range of accessory elements added ("A—Z" solution; Hoagland and Snyder[11])). The test-tubes were lightly plugged with cotton wool to minimise evaporation. Germination and growth took place in an incubator at 25°C in a constant light intensity of 4 foot candles. Under these conditions control redicles reached a length of approximately 40 to 50 mm in 4

days, which was the duration of the assay period. Standard root-inhibition curves were constructed for each of the three herbicides so far used, viz. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2, methyl-4, chloro-phenoxyacetic acid (MCPA) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). Standard 0.1% solutions of these acids were made up and neutralised with caustic soda solution and these were used for preparing a range of dilutions in culture solution. Thus for 2,4-D the final concentrations used were 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1.0 parts per million. Ten to twenty tubes (twenty seeds per tube) were set up at each dilution together with an appropriate number of controls and root growth determined after 4 days under the above conditions. In previous work the total fresh weight of roots had been used as a measure of growth. However, much experimental work has shown that root length is a much more sensitive measure of growth inhibition than fresh weight since this latter includes the stimulation effects of hormones on lateral root production. Ideally the average length of all roots in each sample should be calculated. This is however a very time-consuming operation and very seriously limits the number of samples that can be employed, both in the construction of the standard growth inhibition curves and particularly for the assay of any one sample of perfusate. To reduce this measurement time and therefore to allow a considerable increase in the number of tubes used for each assay, the longest root length method of previous authors was adopted. It has been shown by Forbes-Jones and Baker [8], for the growth of seedling oat roots, that for the first few days of growth after germination there is a very high degree of correlation between total root length in a constant sample of seedlings and the length of the longest root in that sample. The author has shown that a similar correlation holds in the first four or five days of growth of roots in samples of cress seedlings. It seems therefore justifiable to use the length of the longest root in a sample as a measure of the mean root length provided the number of seedlings per sample remains constant. In any case, such a close correlation is by no means a pre-requisite for an assay technique, provided the conditions and the measure of growth remain strictly the same both for the construction of the standard curve and for the assay of perfusate samples. Growth rates in the herbicide solutions were calculated as a percentage of the average of the controls and plotted on linear-log. graph. paper.

Perfusate samples for analysis were of 1 to 2 ml and were sterilised at 100°C for 5 minutes on a water bath before being used to make up a range of dilutions in culture medium. For each sample three tubes were set up for each dilution and for the control in pure culture medium. From seed samples of 20 per tube, longest root lengths were determined after 4 days and growth inhibitions plotted against dilution in a graph on a sheet of perspex using the same coordinates as for the standard curve. By placing this latter transparent curve over the standard curve the two could be adjusted laterally along the

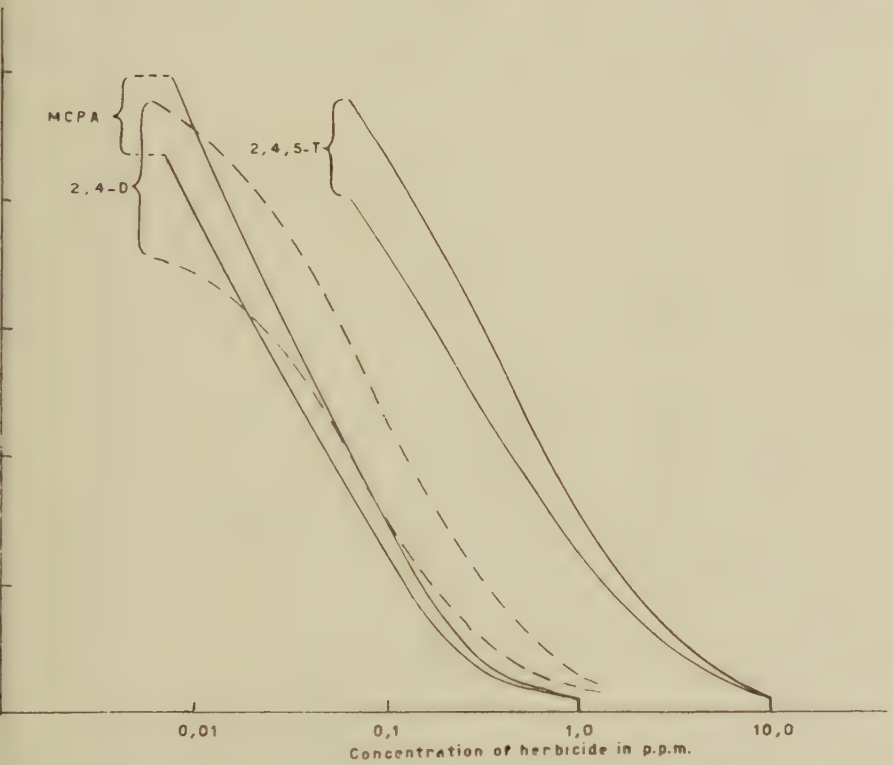


Fig. 2. Herbicide concentration-root growth curves for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2, methyl-4, chlorophenoxyacetic acid (MCPA) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T).

$$\text{Root growth index} = \frac{\text{Root growth in herbicide solution}}{\text{Root growth in control}} \times 100.$$

The two parallel lines for each herbicide represent the limits, on either side of the grand mean, of the standard errors to be expected from means of three samples of 20 seedlings each.

concentration axis until the closest fit was obtained and the actual concentration of herbicide in any perfusate read directly from the standard curve. Figure 2 gives the standard curves for the three herbicides used, the double lines representing the limits, on either side of the grand mean, of the standard errors to be expected from means of three twenty-seed samples at any concentration (as used in each assay). From these graphs therefore one can obtain an idea of the accuracy with which assay and standard curves can be fitted, bearing in mind that two, three and sometimes four different dilutions are used per assay. A rough estimate of the errors involved in this assay has been obtained from perfusions experiments where long series of readings have been taken with little changes in the concentration of herbicide in the perfusate, by measing the deviation of individual readings from the steady drift curve. From a total of 50 determinations with perfusate concentrations ranging between 80 and 100 parts per million, an "expected error" of $\pm$ 10.3 parts per million was calculated *). Since the assay is never used at its maximum sensitivity, at lower concentrations the absolute errors are correspondingly smaller, the percentage error being roughly constant for all perfusate concentrations down to about 0.1 parts per million.

The assay is non-specific and can therefore be used only for solutions of single herbicides of high toxicity. Its use in studying herbicide breakdown in the soil is based essentially on the assumption that the products of decomposition are very much less toxic than the herbicide itself. From all the evidence so far available this would seem to be justified. Sensitive chemical tests do exist, e.g. the chromotropic acid test of F r e e d [9]), but this is also non-specific and not suitable for quantitative use. A specific quantitative test has also been described by B a n d u r s k i [5]) but its use was precluded in these experiments since it involves the use of an ultra-violet spectrophotometer and would be greatly complicated by the presence of unknown breakdown products strongly absorbent over the same spectral frequency range.

---

*) "Expected error" is here defined as $S(x - M)^2/N - 1$, where x is the concentration recorded by the assay, M is the concentration from the smooth dirft curve and N is the total number of values analysed.

THE GENERAL COURSE OF THE DETOXICATION CURVES

The general course of the detoxication (herbicide disappearance) previously found has been verified by a number of experiments with 2,4-D and MCPA, the three aspects, slight initial adsorption, long initial lag and final rapid proliferation phase being distinguishable in most cases. Results with 2,4,5-T have not been so clear-cut.

a) Initial adsorption.

Measurable adsorption of the herbicide onto the soil immediately after the commencement of perfusion has not occurred in all the experiments. In most cases the adsorption was marked and significant while in some it was not detectable by the relatively

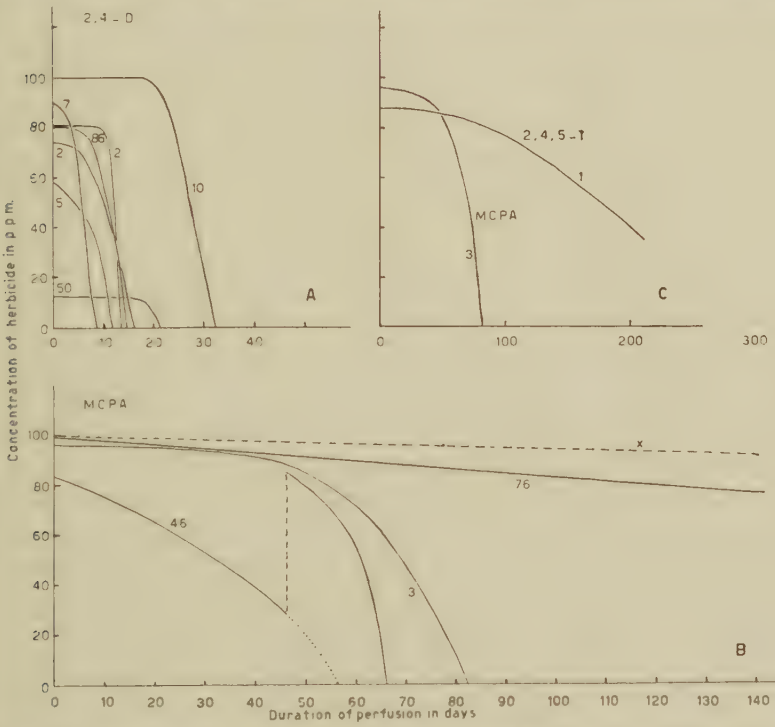


Fig. 3. Smoothed detoxication progress curves for first perfusions showing enrichment phenomena in the three herbicides used, i.e. 2,4-D (Curves A), MCPA (Curves B) and 2,4,5-T compared with MCPA (Curves C; note the different time scale). The numbers against the curves represent the storage life in days of the relevant soil sample. The dotted line "X" in the B series of curves shows the sampling dilution effect for the experiment with the soil stored for 76 days.

inaccurate methods here employed (see Fig. 3). In perfusions of moist soil it is of course masked by the effects of dilution. It is not possible to determine how much of the water content of the moist soil is available for this dilution and so corrections for it are out of the question. In Table I the results of all straightforward initial perfusions of dry soil are collected together. The reduction in the concentration of the perfusate was determined by extrapolating backwards the smoothed curve of the lag phase till it cut the zero time axis and the total quantities adsorbed calculated from this intersect.

TABLE I

2,4-D		MCPA		2,4,5-T	
Final perfusate concentration in p.p.M.	Mg absorbed per g	Final perfusate concentration in p.p.M.	Mg adsorbed per g	Final perfusate concentration in p.p.M.	Mg adsorbed per g
75	0.083	83	0.061	86	0.07
12.5 *)	0.096	95	0.025		
81	0.096	95	0 025		
38	0.31	100	0.0		
21	0.396				
48	0.26				
81	0.095				
100	0.0				

*) 500 g dry soil perfused with 250 ml solution.

These figures are all, with one exception, obtained from 50 g samples of dry soil perfused with 250 ml of the herbicide solution at a concentration of 100 p.p.M. The exception is for an experiment (starred in table) in which 500 g of soil were used and it will be seen that the extent of the adsorption is of the same order as that for the smaller samples. There is a wide variation from experiment to experiment which is partly due to experimental error. The extent of the error varies with the number of concentration determinations made in the lag phase and it is estimated that it will vary from 0:02 to 0.05 mg per g dry soil. The much larger variations which fall outside this range can only be explained by corresponding variations in the soil samples. Although such samples were from the same site they were collected when needed at different times of the year and no particular attempts made to ensure homogeniety. In spite of these large variations it can be seen from the table that this adsorption is a reasonably consistent phenomenon and that the three compounds studied are adsorbed to about the same extent. That this adsorbed herbicide

is still capable of exerting an action on plant growth is shown by the results of experiments in which seeds have been grown on soil which had been thoroughly washed after adsorption to free it of all traces of perfusing solution. The growth of the roots of such seedlings was inhibited to about the same extent as with a culture solution containing one part per million of herbicide. After enrichment however seeds grow normally on such soil.

b) The lag phase.

2,4-D

A considerable number of additional perfusions with this compounds have demonstrated the variable duration of the lag phase in soil samples from the same source. Smoothed curves for such perfusions are drawn in Figure 3A. It will be seen that in some the lag phase is of very short duration, there being some decomposition of the herbicide from commencement of perfusion. In others there is a definite horizontal plateau in the curve before bacterial proliferation becomes apparent. As in the case of the adsorption, there is a considerable variation in the speed of enrichment in these several soil samples. One experimental variable might have accounted for this. Purely for the sake of convenience, soil was usually collected in samples of a kilogramme or so, dried in a current of warm air and then stored, after sieving, in a large glass container. Such storage, it was thought, might have resulted in a progressive reduction in its total viable bacterial population, which might be expected to cause a more sluggish enrichment during perfusion. Against each curve in Figure 3 is recorded the relevant number of days' storage of the experimental sample prior to perfusion. It will be seen that there is no obvious relationship between the duration of such storage life and any particular feature of the enrichment curve. The variations observed must be due therefore to inherent heterogeneity of the soil samples used. Ten experiments give a mean detoxication time of 13.7 $\pm$ 2.82 days.

MCPA

For this compound the rate of enrichment is very much slower, with the result that fewer experiments have so far been completed. The results of three experiments are seen in Figure 3B. Two out of the three show the typical enrichment phenomenon, one with a

marked plateau and the other showing a slow decomposition at the commencement of the perfusion with the onset of a marked enrichment at about 45 to 50 days. In this latter experiment the perfusate was renewed before complete detoxication had been accomplished at 46 days. In the third experiment, which had to be abandoned after 141 days *), no trace of an enrichment phenomenon had appeared up to that time, although a steady breakdown is apparent from the results. The dotted line "X" in the graph shows the decline in concentration due to sampling. That even this slow rate of breakdown is biological seems likely from the results with bacterial poisons. Admittedly this soil sample had been stored dry for 76 days, but little significance is attached to this fact in view of the lack of an effect of storage life in 2,4-D perfusions and also in that the sample with 46 days storage life enriched somewhat more rapidly than a similar sample stored only for three days.

After complete detoxication of the initial perfusates, subsequent perfusions with an identical MCPA solution resulted in the typical accelerated breakdown showing no lag. The results of two such perfusions can be seen in Figure 7B, where reductions of detoxication time from 82 to 14½ days and from 46 to 5 days have resulted during such a second perfusion.

2,4,5-T

So far only one direct perfusion experiment has been performed with this compound and the extremely slow rate of disappearance is shown in Figure 3C, with one of the MCPA enrichment curves plotted on the same time scale for comparison. Only after seven months continuous perfusion has the concentration been reduced to about a third of its original concentration. But even with this slow detoxication rate a significant steepening of the curve with time suggests a very sluggish enrichment phenomenon. Unfortunately the perfusion had to be stopped after seven months, but from the progress of the curves it would appear that the time for complete detoxication at this concentration (100 p.p.M.) would be of the order of 270 days (9 months).

There seems therefore little doubt that the underlying pattern of

*) Abandonment of perfusion results from a gradual loss of crumb structure in soil subjected to long protracted treatment. The onset of such deterioration varies from sample to sample but seldom occurs before 4 and usually not before 6 months.

the enrichment phenomena associated with this breakdown is the same for all three compounds. The differences in the shapes and durations of the detoxication curves can be explained in terms of different rates of proliferation or adaptation of the relevant bacteria, the rates being roughly of the order of 100 : 25 : 5 for 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T respectively. Whether the same organism is responsible for the breakdown of all three compounds is a question which will be discussed later and one which so far has not been systematically tackled. The disturbing variability of behaviour of apparently homogeneous soil samples might be explained by the relative sparseness of educable bacteria in the soil. The occurrence of small, widely-scattered colonies of such organisms might explain why some soil samples take two or three times as long to enrich as do others under otherwise identical conditions.

THE INHIBITION OF DETOXICATION BY SODIUM AZIDE

So far we have presented only indirect evidence for the thesis that bacteria are the detoxicating agents. In order to obtain direct evidence for these suppositions, experiments have been performed by adding strongly inhibiting concentrations of a bacterial poison,

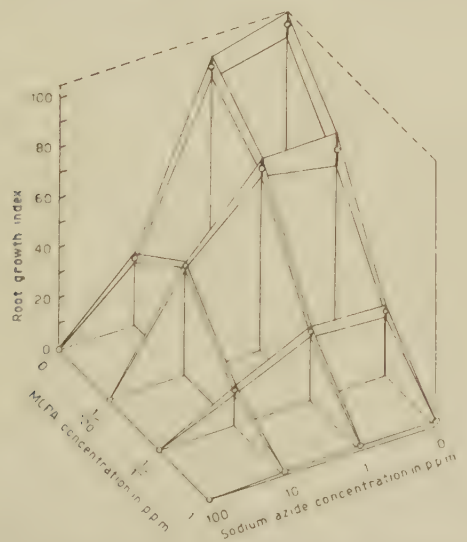


Fig. 4. Three-dimensional graph showing the interaction of MCPA and sodium azide in the inhibition of root growth in cress (*Lepidium sativum*). (for explanation see text).

sodium azide (NaN_3), to fresh perfusates after enrichment had been completed and observing subsequent changes in herbicide concentration in that perfusate.

Possible practical difficulties however become apparent at this point, since sodium azide is also a very potent plant poison and its

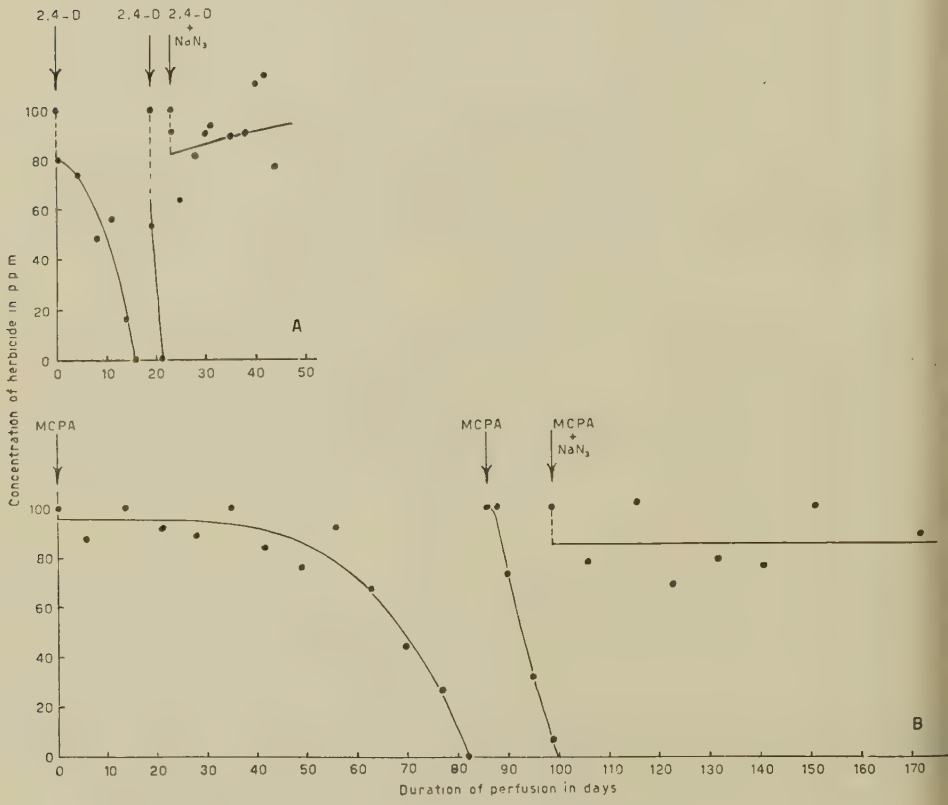


Fig. 5. Graphs showing the effect of a bacterial poison (sodium azide) on the breakdown, by enriched soils, of 2,4-D (Curve A) and MCPA (Curve B).

presence in perfusate samples might have made the cress root assay unusable, in spite of the much greater toxicity of the herbicide. In order to check this point, extensive root-growth tests were carried out with the normal assay technique using a wide range of herbicide and azide concentrations, singly and in all possible combinations. The combined results of one set of such tests on MCPA are incorporated in Figure 4, which is a three-dimensional graph with root

growth plotted vertically and concentration (on a logarithmic scale) of azide and MCPA respectively as the two horizontal ordinates. The mean root growth for each concentration or combination of concentrations was calculated as a percentage of the mean of the controls (Root Growth Index). The circles mark the means from six samples of twenty seeds each and the thick vertical lines mark the extent of its standard error on either side.

In these perfusion experiments 100 parts per million of herbicide were combined with 100 parts per million of sodium azide, which latter concentration has been found to give virtually complete inhibition of certain bacterial processes in the soil (see Mann and Quastel[15]). In the assay of samples of this mixed perfusate, dilutions were chosen so that the final herbicide concentrations fell within the range $^{1}_{100}$ to $^{1}_{10}$ parts per million. If no breakdown had taken place, this would mean a resultant azide concentration of the same order, and one which would have no effect on the root growth. Even if the herbicide concentration were reduced during the course of the perfusion to $^{1}_{100}$ th. of its original concentration, below which it is not necessary to go, i.e. a reduction of from 100 p.p.M. to 1 p.p.M., then, after suitable dilution, the concentration of azide in the assay medium would still be only 1 p.p.M., at which concentration it has no effect on the inhibitions produced by MCPA, as will be seen from Figure 4. Closely similar results were obtained for 2,4-D. It was thought therefore quite justifiable to use cress root growth assay for such perfusions in the presence of azide, at least for final concentrations of herbicide in the perfusate not lower than 1 part per million, thus allowing a possible 99% reduction in perfusate concentration before any serious errors due to azide might be expected to appear.

Two experiments have been performed along these lines, one with 2,4-D enriched soil and one with MCPA-enriched soil. The results of these two experiments are shown in Figs. 5A and B. In both cases, after an initial enrichment perfusion, a second perfusion with a solution of herbicide alone was carried to completion to ensure a high detoxicating activity. The mixture of hormone and azide was then perfused. With both herbicides there is a sharp initial drop in the concentration due partly to the effects of dilution with the detoxicated soil water and presumably in part to adsorption phenomena. Subsequently however there is no disappearance of herbicide over periods of time longer than the initial enrichment lag period in each

case. In the 2,4-D experiment there is an apparent rise in the concentration, which was in fact due to an unusually rapid evaporation of perfusate, which was not made good in this particular experiment by additions of distilled water.

These results were taken to constitute final proof that, with 2,4-D and MCPA at least, the decomposition which these herbicides undergo in soil is due entirely to the action of microorganisms, presumably bacteria.

THE ISOLATION OF AN EFFECTIVE ORGANISM

Having satisfactorily proved the biological nature of the detoxication process, the next step was to isolate the effective organism and to this end drops of perfusate from soil enriched with the 2,4-D organism were spread on agar plates of basal medium containing 0.1% of the sodium salt of 2,4-D as the only source of carbon. A preliminary account of this work has already been published (A u d u s [3]). The constitution of the medium was:

Acid ammonium phosphate	0.1 %
Potassium chloride	0.02 %
Magnesium sulphate	0.02 %
Sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate	0.1 %
Agar to stiffen	
pH = 7.0	

The plates were subsequently incubated at 25°C. In most cases after 7 to 10 days uniform translucent colonies, apparently of a single species of bacterium appeared with regular fungal contaminants. The latter appeared at an early stage and produced an extremely fine loose mycelium which rapidly covered the plate and produced a number of spores on small conidial heads somewhat resembling very depauperate *Penicillium*. After this the fungi produced no further growth and interfered in no way with the growth of the bacterial colonies. Owing to the sparse nature of the fungal growth it was not difficult, by using a × 30 binocular dissecting microscope, to isolate the bacterium in pure culture on 2,4-D basal medium. The organism has been kept growing on such a medium for the last twelve months by repeated subcultures at intervals of 14 to 30 days but there has been a progressive loss of vigour over this interval.

That the organism is undoubtedly responsible for 2,4-D breakdown in enriched soils is borne out by the results of two experiments.

In the first, 50 g of dry soil crumbs were perfused with the usual 250 ml of 100 p.p.M. 2,4-D solution to which had been added a suspension in glass distilled water, of the bacterium, taken from a relatively vigorous culture on 2,4-D agar. Subsequent 2,4-D breakdown was rapid and completed in less than two days and a second amount of 25 mg added to the perfusate after a further three days was com-

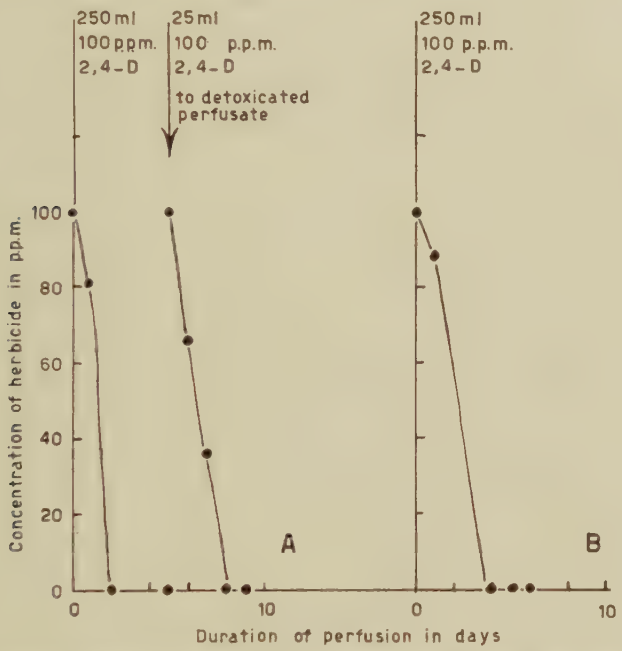


Fig. 6. Curves showing the effect of inoculation of the perfusate with a thick suspension of the 2,4-D organism on the subsequent breakdown of 2,4-D on perfusion through (A) a freshly dried 50 g soil sample and (B) a plug of glass wool.

pletely decomposed in under three days. These results are shown in Figure 6A. The rates of breakdown are of the same order as those in an enriched soil. This suggests that the number of bacteria responsible in 50 g of enriched soil corresponds roughly to the number added from the pure culture, i.e. about 50 hemispherical colonies of 1 to 2 mm diameter, and rough calculations indicate that the absolute rate of decomposition per unit weight of bacterial cell corresponds favourably with the rates of oxidation of aromatic ring compounds by other adaptive bacteria.

A further experiment was carried out in which 240 ml of a 100 parts per million 2,4-D solution containing a similar bacterial suspension was perfused through a plug of sterile glass wool in place of the usual 50 g of dry soil. A similar rapid breakdown of 2,4-D was completed within 4 days, showing that active bacteria can continue, for a time at least, to decompose this compound in pure solution at something approaching the maximal rate (see Figure 6B).

On agar plates of 2,4-D medium the bacterium forms small smooth translucent punctiform colonies of a dull greyish cream colour and an inidescent sheen which fuse to form large irregular colonies if growth is allowed to continue for a period of months. A characteristic feature of this growth is that there seems to be a steady decrease in vigour with each successive subculture on 2,4-D agar. After ten months the progeny of the original isolation are producing scarcely perceptible growth whereas new isolations are forming 1—2 mm colonies in from 4 to 5 days at 25°C. Experiments are now in progress to determine the cause of this loss of vigour.

The bacterium itself is a short non-motile rod of dimensions 4 $\mu \times 8\,\mu$ and is gram negative with bipolar gram positive granules, indicating a close relationship with the *Corynebacteria*. Its growth and fermentation reactions on differentiating media place it in the "*Bacterium globiforme* group" of Lochhead and Taylor [14]). This is a group of very common soil organisms, the original isolation and description of the type having been made by Conn [6]). The 2,4-D organism differs however from typical *B. globiforme* in that, after continuous growth on the same plate for a month or so or after continuous subculturing, no cocci are formed. Instead, the bacteria become somewhat longer, reaching a length of 1.2 to 1.4 μ in some cases. Conn and Darrow [7]) described forms which behaved in a similar manner in that they retained their rod-like shape and formed no cocci. These differences may be pleomorphic and induced by the unusual carbon substrate. Its full behaviour on other media still remains to be studied.

That the bacterium is using 2,4-D as a sole source of carbon is strongly indicated by the fact that repeated attempts to grow it upon basal agar medium alone have failed. It also fails to grow in an aqueous 2,4-D medium in the absence of agar, but when traces of agar (0.1%) are added some growth occurs at the surface. Like the type *B. globiforme* it is thus an obligate aerobe. Its inability to grow

in the complete absence of agar suggests that it obtains from that substance some essential growth factor. Such a growth factor should also be present in soil and a few preliminary experiments using soil extracts indicate that this is indeed the case.

CROSS-PERFUSION EXPERIMENTS

One of the ultimate aims of experiments in this field is the

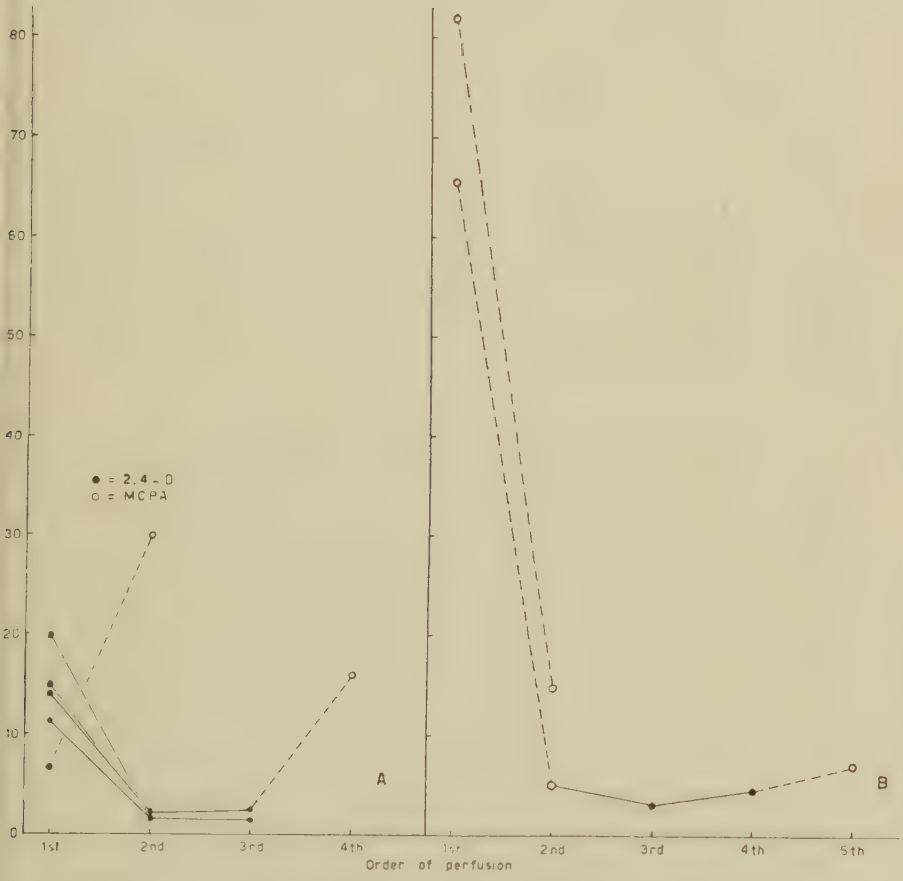


Fig. 7. Graphs showing the results of cross-perfusion experiments.
(*A*) Times of detoxication of MCPA by 2,4-D-enriched soils.
(*B*) Times of detoxication of 2,4-D by MCPA-enriched soils.
(For further explanation see text).

elucidation of the biochemical mechanisms whereby these highly stable organic molecules can be broken down by microorganisms.

Little attention has so far been paid to the fission of aromatic rings by bacteria although in the years since the second world war rapid strides have been made by Evans and, following him, Stanier (see reviews by Happold[10]) and Stanier[18]). The methods used have been largely based on the study of adaptive behaviour to various compounds and would be eminently suitable for the present problem of herbicide breakdown. It can only be satisfactorily used however if reasonably thick suspensions of the bacteria can be obtained and experiments with this end in view are at present in progress.

It was hoped however that in the meantime some indication of the mechanism of breakdown could be obtained by studying the reactions of any particular enrichment flora to analogues of the enriching molecule. From a study of the behaviour pattern some idea of the initial point of attack on the molecule might be expected to emerge. Such experiments were started in the summer of 1948 but since, with such stable molecules as MCPA, enrichment is a very lengthy process, results have been slow to accumulate.

The behaviour of 2,4-D enriched soil.

A number of experiments have been carried out in which 2,4-D enriched soil has been perfused with 100 p.p.M. MCPA solution. The results are collected together in Figure 7A, where the time taken for complete detoxication in successive perfusions is plotted diagramatically. The enrichment phenomena with successive 2,4-D perfusions are clearly seen, in the marked reduction in detoxication time for the second, third, etc. 2,4-D perfusions (solid dots). Perfusion of MCPA through such enriched soils gives detoxication times which are much shorter than those for initial MCPA enrichment perfusions (first open circle values of Figure 7B). In addition the progress of this detoxication shows no lag phase (see Figure 8B). These detoxication-times are however somewhat longer than those for the second MCPA perfusion after an initial enrichment perfusion with that substance (Graph 7B). This indicates that the 2,4-D flora is capable of decomposin MCPAg but not at such a high rate as the MCPA flora itself. The absence of lag when MCPA is decomposed by the 2,4-D enriched soil is a strong indication that the same flora is capable of attacking both molecules direct. This has been proved by perfusion of un-enriched soil with 100 p.p.M. MCPA solution containing a suspension of the 2,4-D

organism in pure culture when detoxication took place without any appreciable lag phase but a slow absolute rate. These slower rates of MCPA breakdown by the 2,4-D flora, as compared with a soil enriched by MCPA direct, suggest either that different organisms

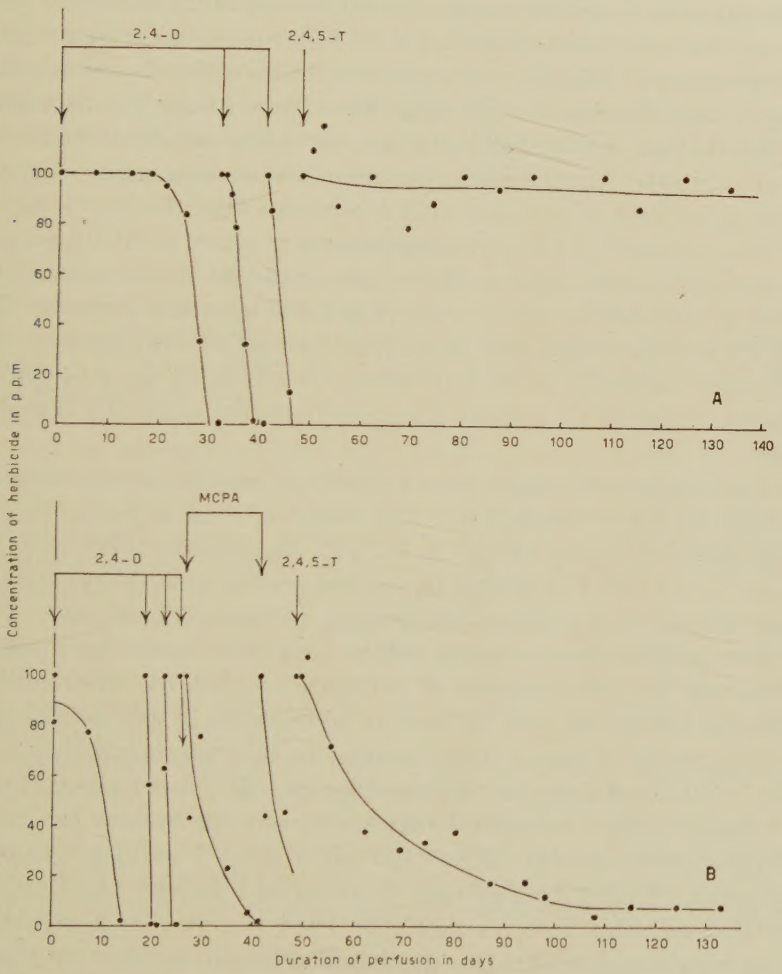


Fig. 8. Curves showing the progress of detoxication of 2,4,5-T in soils enriched by (*A*) three successive perfusions of 2,4-D and (*B*) four successive perfusions of 2,4-D followed by two of MCPA.

constitute these two enrichment floras or that different adaptive enzyme systems develop in the same organism in response to the two

enrichment treatments. The latter would seem to be the most probable.

The results of experiments using the reverse procedure, i.e. the perfusion of 2,4-D through MCPA enriched soil, shows an identical phenomenon, i.e. an immediate decomposition of the 2,4-D but at a somewhat slower rate than that of a 2,4-D enriched soil (Figure 7B). Here again the adaptive enzyme system is capable of dealing with both substrates but is somewhat less efficient with the "foreign" substrate (here 2,4-D) than is the enzyme system adapted directly to that substrate. An interesting feature of one of these experiments is that subsequent return to an MCPA perfusate after the interpolation of two successive 2,4-D perfusions, results in a rate of MCPA breakdown of the same order as that of the initial MCPA-enriched rate. This is confirmation of the view that 2,4-D is broken down by the MCPA enzyme system and shows that a period of breakdown of this "foreign" substrate in no way affects its efficiency for subsequent MCPA breakdown, i.e. there is no re-adaptation to the 2,4-D molecule.

Two experiments have been carried out on the detoxication of 2,4,5-T by 2,4-D enriched soil. The results of these experiments are reproduced in Figure 8A and B. In both experiments there were an initial series of 2,4-D perfusions and the results show the typical lag phenomena. In A this was followed by perfusion of 250 ml of 100 p.p.M. 2,4,5-T solution and it will be seen that, except for a slight reduction in concentration of perfusate, caused by dilution and possible adsorption affects, there is no evidence of any breakdown over a period of nearly three months. In the experiment shown in 8B, 2,4-D enrichment was followed by two MCPA perfusions, both of which resulted in rapid detoxications showing no new lag. Subsequent perfusion with 250 ml 100 p.p.M. 2,4,5-T solution resulted, in contrast to the *A* experiment, in an initial relatively rapid rate of breakdown. This however slowly declined to zero over a period of two months and beyond this the detoxication did not proceed below the apparently stable level of 92% (i.e. 8% of the original perfusate concentration remaining). These results suggest that during the MCPA perfusions the relevant enzyme systems of the 2,4-D organism had been so modified as to acquire the capacity to attack, 2,4,5-T but that for some unknown reason, e.g. accumulation of toxic decomposition products, this newly acquired activity was slowly lost.

It is realised that these preliminary results on cross-perfusions are very meagre and require additional confirmatory work but they do at least illustrate the complexity of the adaptive patterns which may be set up by different herbicides possibly in one and the same organism. It is the fact that one may be dealing, in these perfusions experiments, with a flora composed of more than one species and not a pure culture that urges great caution in formulating hypotheses to explain these results. Such tentative suggestions that have been thrown out must be ultimately confirmed by tracing such adaptive patterns in the organism themselves growing in pure culture.

SUMMARY

(1) The results of experiments on the continuous perfusion of aerated solutions of the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2, Methyl-4, chlorophenoxyacetic acid (MCPA) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) through garden soil indicate that the kinetics of their breakdown are essentially similar.

(2) Three phases can be distinguised: (*a*) an immediate initial adsorption onto soil colloids amounting to 0.167 $\pm$ 0.035 mg per g dry soil, (*b*) a lag phase of varying duration in which there is little or no disappearance of herbicide, (*c*) a final phase of rapid complete detoxication. Such "enriched" soils detoxicate subsequent perfusions with the same herbicide molecule at a constant high rate. Enrichment times for 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T are roughly of the order or 14, 70 and 270 days respectively.

(3) This indirect evidence, from kinetics of detoxication, of the development of a bacterial flora adapted to herbicide breakdown, is strongly supported by experiments in which the detoxicating activity of such enriched soils was completely destroyed by low concentrations (0.01%) of the bacterial poison, sodium azide.

(4) Attempts to isolate in pure culture the 2,4-D-decomposing organism were successful. Preliminary classification work relegates the organism to the "*Bacterium globiforme* group". Further confirmatory work is required.

(5) Cross perfusion experiments in which 2,4-D enriched soils were perfused with MCPA and vice versa indicate that both can detoxicate the other analogue, although at a somewhat lower rate than the soil directly enriched with that analogue.

(6) 2,4-D enriched soil will not detoxicate 2,4,5-T although some activity may be temporarily induced by an intermediate perfusion with MCPA.

Received December 28, 1950.

REFERENCES

1) A u d u s, L. J., A new soil perfusion apparatus. Nature (London), **158**, 419 (1946).
2) A u d u s, L. J., The biological detoxication of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. Plant and Soil **2**, 31–35 (1949).

3) Audus, L. J., Biological detoxication of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soils: Isolation of an effective organism. Nature (London) **166**, 356 (1950).
4) Audus, L. J., and Quastel, J. H., Coumarin as a selective phytocidal agent. Nature (London) **159**, 320–324 (1947).
5) Bandurski, R. S., Spectrophotometric method for the determination of 2,4-D. Botan. Gaz. **108**, 446–449 (1947).
6) Conn, H. J., A type of bacterium abundant in productive soils but apparently lacking in certain soils of low productivity. Tech. Bul. 138, N.Y. Agric. Exp. Station (1928).
7) Conn, H. J., and Darrow, N. A., Influence of various non-nitrogenous compounds on the growth of certain bacteria in soils of low productivity. Tech. Bull. 172, N.Y. Agric. Exp. Station (December 1930).
8) Forbes-Jones, R., and Baker, H. G., The effect of some purines and related compounds on the seedling growth of *Avena sativa* L. Ann. Botany N.S. **7**, 379–390 (1943).
9) Freed, V. H., Qualitative reaction for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Science **107**, 98–99 (1948).
10) Happold, F. C., The oxidation of aromatic rings by micro-organisms in metabolism. Biochemical Society Symposia, No. 5, p. 85–96, Cambridge (1950).
11) Hoagland, D. R., and Snyder, W. C., Nutrition of the strawberry plant under controlled conditions. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **30**, 288–294 (1933).
12) Kandler, O., Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Atmungsstoffwechsel und Wachstumsvorgängen in vitro kultivierten Maiswurzeln. Z. Naturforsch. **56**, 203–211 (1950).
13) Lees, H., and Quastel, J. H., Biochemistry of nitrification in soils. I. Kinetics of, and the effects of poisons on, soil nitrification as studied by a soil perfusion technique. Biochem. J. **40**, 803–828 (1946).
14) Lochhead, A. G. and Taylor, C. B., Qualitative studies in soil micro-organisms. Can. J. Research C. **16**, 152–173 (1938).
15) Mann, P. J. G. and Quastel, J. H., Manganese metabolism in soils. Nature (London) **158**, 154 (1946).
16) Newman, A. S. and Thomas, J. R., Decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil and liquid media. Proc. Soil Sci. Soc. Am. **14**, 160–164 (1950).
17) Nutman, P. S., Thornton, H. G. and Quastel, J. H., Plant growth substances as selective weedkillers. Inhibition of plant growth by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other plant growth substances. Nature (London) **155**, 497 (1945).
18) Stanier, R. T., Problems of bacterial oxidative metabolism. Bacteriological Reviews **14** 179–191 (1950).